

# **EPENDYMOOMIEN KLIINISPATOLOGISET JA IMMUNOHISTOKEMIAALLISET ENNUSTETEKIJÄT**

LK Annina Raita  
Syventävien opintojen kirjallinen työ  
Tampereen yliopisto  
Lääketieteen yksikkö  
Aivokasvaintutkimusryhmä  
Joulukuu 2014

Tampereen yliopisto  
Lääketieteen laitos  
Aivokasvaintutkimusryhmä

ANNINA RAITA:               EPENDYMOOMIEN KLIINISPATOLOGISET JA  
                                     IMMUNOHISTOKEMIAALLISET ENNUSTETEKIJÄT

Kirjallinen työ 37s.

Ohjaajat: dos. Hannu Haapasalo ja FT Kirsi Granberg

Joulukuu 2014

Avainsanat: FGFR3, fuusiogeeni, gliooma, ennuste, Ki-67, MIB-1

---

Glioomiin kuuluvat ependymoomat ovat aivokammioita ja selkäydinkanavaa verhoavista ependymisololuista lähtöisin olevia aivokasvaimia. Ependymoomat jaetaan neljään alatyypin histologisen pahanlaatuisuusasteen (WHO gradus I-III) ja muiden histologisten piirteiden perusteella. Alatyypit ovat subependymooma ja myksopapillaarinen ependymooma (I), ependymooma (II) ja anaplastinen ependymooma (III).

Tutkimuksen tavoitteena on selvittää kliinispatologisten ja immunohistokemiallisten, erityisesti fibroblastikasvutekijäreseptori 3:n (FGFR3) merkitystä ependymoomien diagnoosin ja ennusteen arvioinnissa.

Ependymoomapotilaan ennusteeseen vaikuttaa kasvaimen gradus ja histologinen tyyppi, proliferaatioindeksi (MIB-1) sekä hyvä hoitovaste. Oman tutkimuksen tulokset olivat samansuuntaiset, mutta eivät tilastollisesti merkitseviä. Sen sijaan kasvaimen sijainti oli yhteydessä sekä kokonais- että tautivapaaseen ennusteeseen ja potilaan ikä yhteydessä tautivapaaseen ennusteeseen merkitsevästi. Selkäytimen ependymoomien ennuste on usein hyvä, aivorungon ja takakuopan alueen ependymoomien ennuste on huonoin. Nuoret ja ikäihmiset saavat muita todennäköisemmin residivikasvaimen.

Fuusiogeeni on kahdesta aiemmin erillisestä geenistä uudelleen järjestäytynyt hybridigeeni. FGFR3-geeni voi muodostaa fuusiogeenejä muiden geenien kanssa, ja toimia näin onkogeenisena mekanismina. Promootorialueiden vaihto, mikro-RNA:n alaisuudesta poistuminen ja kasvutekijäreseptorin lisääntynyt signaointi ovat eräitä FGFR3:n syövän synnylle altistavia mekanismeja. Myös mutaatiot FGFR-geenissä voivat tehdä geenistä onkogeenisen mm. aiheuttamalla reseptorin yliaktiivisuutta. Fuusiot saattavat toimia lupavana lääkehoidon kohderyhmänä.

Tässä tutkimuksessa kasvaimen positiivinen FGFR3-ekspressio oli yhteydessä korkeamman graduksen ependymoomiin. Gradus I kasvainten FGFR3-ekspressio oli negatiivinen. Myös iän ja positiivisen FGFR3-ekspression välillä havaittiin yhteys; nuorten ja ikäihmisten FGFR3-ekspressio oli muita useammin positiivinen. Positiivinen FGFR3-ekspressio näytti olevan myös yhteydessä sekä potilaan huonompaan elinaikaennusteeseen että kasvaimen uusiutumiseen.

# SISÄLLYS

<b>1 JOHDANTO</b>	1
1.1 Yleistä glioomista	1
1.2 Ependymoomat	2
1.2.1 Myksopapillaarinen ependymooma	3
1.2.2 Subependymooma	4
1.2.3 Ependymooma WHO gradus II	5
1.2.4 Anaplastinen ependymooma	5
1.3 Ependymoomien molekyylipatologiaa	6
1.4 Kliinispatologiset ennustetekijät	7
1.5 Immunohistokemialliset ennustetekijät	8
1.5.1 MIB-1	8
1.5.2 Muut immunohistokemialliset ennustetekijät	8
1.5.3 FGFR3	9
1.6 Ependymoomien hoito	10
1.7 Tutkimuksen tavoitteet	11
 <b>2 AINEISTO JA MENETELMÄT</b>	 11
2.1 Potilasaineisto	11
2.2 Immunohistokemialliset menetelmät	13
2.2.1 MIB-1-menetelmät A ja B	13
2.2.2 MIB-1-värjäysten kuva-analyysi	13
2.2.3 FGFR3-värjäys ja analyysi	14
2.3 Tilastolliset menetelmät	15
 <b>3 TULOKSET</b>	 15
3.1 Kliinispatologisten muuttujien keskinäiset suhteet	15
3.2 MIB-1-värjäysanalyysit	17
3.3 FGFR3-värjäysanalyysi	19
3.4 Kokonaisseuranta-aika ja tautivapaa seuranta-aika	21
3.4.1 Kokonaisseuranta-aika	21
3.4.2 Tautivapaa seuranta-aika	24
3.5 Coxin monimuuttujamalli	28
 <b>4 POHDINTA</b>	 29
4.1 MIB-1	29
4.2 FGFR3	30
4.3 Lopuksi	32

## LÄHDELUETTELO

# 1. JOHDANTO

## 1.1 Yleistä glioomista

Aivokasvaindiagnoosissa keskeistä on histopatologia, immunohistokemia ja molekyyli-genetiikka yhdistettynä kliiniseen ja neuroradiologiseen tietoon. Aivokasvaimet nimetään pääsääntöisesti sen solutyypin mukaan, josta kasvaintyyppin oletetaan olevan lähtöisin.

Aivokasvaimista yleisimpiä ovat glioomat eli tukisolukasvaimet. Glioomat ovat hermokudoksen tukisolukosta eli gliasoluista tai niiden kantasoluista lähtöisin olevia kasvaimia. Ongelmia glioomien diagnostiikkaan tuo kasvaimessa vallitsevan solutyypin vaihtelu sekä vaihteleva alueittainen rakenne (fenotyyppi). Kasvainten genotyyppissä on myös huomattavaa vaihtelua.

Glioomat jaotellaan histologisen tyyppin mukaan astrozytomaan, oligodendrogliomaan, edellisten sekamuotoihin sekä ependymomaan. Astrozytomaat ovat yleisimpiä gliomia, ja niiden pahanlaatuisin alatyyppejä on glioblastoma. Lähes kaikilla gliomilla on taipumus uusia ja muuttua pahanlaatuisemmaksi.

Keskushermostokasvainten pahanlaatuisuusasteen määrittely (gradus) poikkeaa monien muiden syöpien gradeeraus-menetelmistä. Kasvaimen ilmentämää tiettyä histologiaa verrataan kasvaimen biologisen käyttäytymisen kanssa ja näiden tietojen perusteella tuumori saa luokan Maailman Terveysjärjestön (World Health Organization, WHO) neliporaisesta luokitusjärjestelmästä (gradus I–IV) (1). Hyvänlaatuiset ja hitaasti kasvavat kasvaimet saavat yleensä histologisen graduksen I. Ne ovat parannettavissa kirurgisesti radikaalilla hoidolla. Gradus III–IV kasvaimet ovat pahanlaatuisia, nopeakasvuisia ja ne uusiutuvat usein hoidosta huolimatta. Ne infiltroivat helposti ympäröivään kudokseen, mikä tekee niiden kirurgisesta poistosta erittäin vaikean. Myös graduksen II kasvaimilla on taipumusta pahanlaatuistumiseen. Graduksen III kasvaimet ovat selvästi pahanlaatuisia ja mittoottisesti aktiiveja ja graduksen IV kasvaimet erittäin nopeakasvuisia ja kaikkein pahanlaatuisimpia tuumoreita. (1)

## 1.2 Ependymoomat

Ependymoomat ovat aivokammioita verhoavista endodyymisolusta lähtöisin olevia tai niiden kantasoluista muodostuneita glioomia. Ne jaetaan alatyyppeihin graduksen ja histologisten piirteiden mukaan.

Ependymoomat käsittävät 3–9 % kaikista neuroepiteelisistä tuumoreista (2). Lapsilla endodymoomia on 6–12 % ja alle 3-vuotiailla 30 % kaikista intrakraniaalisista (kallonsisäisistä) tuumoreista. Infratentoriaalisia eli pikkuaivoteltan alapuolisia endodymoomia tavataan eniten lapsilla ja niihin sairastuneiden keski-ikä on 6,4 vuotta. (3) Aikuisilla endodymooma on selkäytimen yleisin kasvain (50–60 % selkäytimen gliomista). Selkäytimen tuumoreita ilmentyy eniten 30–40 -vuotiailla. Supratentoriaalista endodymoomaa tavataan sekä lapsilla että aikuisilla. (1)

Ependymoomien ilmaantuvuus Euroopassa oli vuonna 2007 2:1 000 000. Kasvaimia diagnosoidaan noin 500 kappaletta vuodessa Euroopan unionin alueella. (4) Ependymoomat ovat kuitenkin harvinaisuudestaan huolimatta lasten kolmanneksi yleisin aivokasvain tyyppi (7 %) astrozytooman ja medulloblastooman jälkeen (5).

Vuonna 2009 tehdyssä 1 402 potilaan tutkimuksessa havaittiin merkitsevä yhteys endodymooman ja sukupuolen välillä (6). Ilmaantuvuus oli miehillä korkeampaa. Myös rodulla saattaa olla merkitystä endodymooman ilmaantuvuuden kanssa, sillä ilmaantuvuus oli yli kaksinkertaisesti suurempaa valkoisilla kuin afrikkalaisilla USA:n syöpärekisterin mukaan (7).

Ependymoomia esiintyy kaikkialla aivokammioissa ja selkäydinkanavassa. Useimmiten kasvain kehittyy neljänteen aivokammioon ja selkäytimeen, sivukammioihin, sekä kolmanteen aivokammioon. (8, 9) Aikuisilla yhtä yleisiä ovat infratentoriaaliset ja selkäytimen endodymoomat, lapsilla taas yleisimpiä ovat infratentoriaaliset endodymoomat (10). Erityisesti lapsilla voi esiintyä supratentoriaalisen parenkymin endodymoomaa kammiojärjestelmän ulkopuolella. Selkäytimen endodymoomat ovat usein kaularangan ja kaula-rintarangan alueella ja myksoepillaarisia endodymoomia tavataan taas selkäytimen karkiosassa. (11)

Oirekuvaan vaikuttaa iän ja tuumorin kasvunopeuden lisäksi kasvaimen sijainti. Infratentoriaalisten endodymoomien oireet voivat muistuttaa hydrokefaluksen tai kohonneen intrakraniaalisen paineen oireita. Näihin kuuluvat mm. päänsärky, pahoinvointi, oksentelu ja huimaus. Aivojen takakuopassa olevat kasvaimet voivat myös aiheuttaa pikkuaivoperäistä ataxiaa, näköhäiriöitä, huimausta ja osittaista halvausta. Supratentoriaaliset kasvaimet aiheuttavat kasvaimen sijainnin mukaisia

neurologisia oireita, epileptisiä kohtauksia ja intrakraniaalista paineen nousua. Pään laajentumista voi tapahtua alle 2-vuotiailla lapsilla. Selkäytimen endymoomat aiheuttavat perifeerisiä motorisia ja sensorisia oireita. (12) Aivorungon kasvainten oireita ovat mm. aivohermotoimintojen puutokset, nielemis- tai puhevaikeudet, toispuoliset halvaukset tai neliraajapareesi sekä päänsärky ja pahoinvointi. (13)

Graduksen I endymoomiin kuuluvat myksopapillaarinen endymooma ja subendymooma. Ne ovat endymoomista hyvänlaatuisimpia ja hitaimmin kasvavia. Endymooma kuuluu graduksen II kasvaimiin, ja on edellisiä pahanlaatuisempi. Anaplastinen endymooma on alatyypeistä pahanlaatuisin ja se kuuluu gradukseen III. (1)

### **1.2.1 Myksopapillaarinen endymooma**

Myksopapillaarinen endymooma (WHO gradus I) on hitaasti kasvava, hyvänlaatuinen endymaalinen gliooma. Sitä todetaan lähes pelkästään selkäytimen kärkeosassa. Kasvaimet ovat usein kapseloituneena, eivätkä ne yleensä infiltroi ympäröiviin kudoksiin. Verenvuotoa ja kystisiä muutoksia saattaa näkyä. Kasvain on jakautunut lohkoihin ja sen ulkomuoto on pehmeä ja harmahtava.

Tuumorisolut ovat kuutiomaisia tai lieriömäisiä ja ne järjestäytyvät papillaarisesti verisuonten strooman ympärille. Osassa kasvaimista ei kuitenkaan ole papillaarisia alueita, vaan solut ovat pitkulaisia ja ne ovat järjestäytyneet juosteiksi. Mitoottinen aktiivisuus on pientä, mikä korreloi alhaisen MIB-1-värjäytymisindeksin kanssa. (14)

Myksopapillaarista endymoomaa tavataan lähes poikkeuksetta selkäytimen kärjen rakenteissa conus medullariksessa, cauda equinassa ja filum terminalessa. Tuumori voi olla lähtöisin filum terminalen endymisolukosta. Myksopapillaarista endymoomaa on tavattu myös kaularintarangan alueen selkäytimessä, neljännessä aivokammiossa, sivukammioissa ja aivojen parenkyymissä. Kasvain tunkeutuu harvoin hermojuuria pitkin kohti ääreishermostoa tai vaurioittaa ristiluuta.

Tyypillinen oire on pitkään jatkunut selkäkipu. Magneettikuvaus paljastaa usein selvästi ympäristöstä erottuvan massan, joka näkyy kuvassa kirkkaana. (1)

Kaikkien endymoomien joukosta 9–13 % on myksopapillaarisia endymoomia (15).

Ilmaantuvuus vuodessa on miehillä 0,8/1 000 000 ja naisilla 0,5/1 000 000. Myksopapillaarinen

ependymooma on yleisin cauda equina-alueen intramedullaarinen kasvain (7). Tutkimuksessa, jossa oli mukana 320 filum terminalen-ependymoomaa, tapauksista 83 % oli myksopapillaarista alatyyppejä. Myksopapillaariseen ependymoomaan sairastuneiden ikäjakauma on laaja (16–82 vuotta). Potilaiden ikä on diagnoosin aikana keskimäärin 36 vuotta. (16)

### 1.2.2 Subependymooma

Subependymooma (WHO gradus I) on hitaasti kasvava, hyvänlaatuinen aivokasvain. Se muodostuu vaihtelevan kokoisista, kiinteiksi rykelmiksi kerääntyneistä hermotukikudossoluista, jotka muodostavat aivokammioiden lumeniin työntyvän kasvaimen. Tuumori on yleensä tarkkarajainen ja siinä saattaa näkyä kalkkeutumista tai verenvuotoa. Tuumorin halkaisija jää tavallisesti alle 2 cm:n mittaiseksi. (1)

Tyypillisiä histologisia löydöksiä ovat tiiviit tumakeräymät. Solut ovat kerääntyneet joskus verisuonten ympärille, muodostaen pseudorosetteja. Varsinkin sivukammioiden tuumoreissa esiintyy runsaasti pieniä kystia. Mitoosit ovat erittäin harvinaisia, eikä niitä tavallisesti ilmene lainkaan. MIB-1-tutkimuksissa proliferatioindeksi jäi alle 1 prosentin, mikä korreloi tuumorin hitaan kasvun ja hyvänlaatuisuuden kanssa (17). Kasvainsoluissa esiintyy ependymisoluille tunnusomaisia ominaisuuksia, kuten värekarvoja ja mikrovilluksia.

Yleisin sijainti subependymoomalle aivoissa on neljäs aivokammio (50–60 % tapauksista) tai sivuaivokammiot (30–40 % tapauksista). Harvinaisempia ilmenemiskohtia ovat kolmas aivokammio ja septum pellucidum, joka sijaitsee sivukammioiden etusarvien välissä. Selkäytimessä yleisin sijainti intramedullaarisesti on kaularangan tai kaula-rintarangan alueella. Extramedullaariset tuumorit ovat harvinaisia. (18)

Subependymoomat saattavat aiheuttaa kammioiden ahtautumista ja intrakraniaalisen paineen nousua. Neljännen aivokammion suurikokoiset tuumorit voivat johtaa aivorungon puristustilaan ja aiheuttaa sen myötä erilaisia oireita. Spontaania kasvaimen sisäistä verenvuotoa on myös havaittu. Selkäytimen kasvaimet aiheuttavat motoriikan ja tuntoaistin vaurioita. Vauriokohta ja oireet riippuvat tuumorin anatomisesta sijainnista selkäytimessä. (1)

Subependymoomien todellista ilmaantuvuutta on vaikea määrittää, sillä suurin osa näistä kasvaimista säilyy oireettomina pitkään ja diagnoosi tehdään usein sivulöydöksenä vasta ruumiinavauksessa. Kahdessa tutkimuksessa subependymoomien ilmaantumisosuus kaikista

ependymooman alatyypeistä oli 8 %. (9, 15) Subependymoomaa esiintyy eniten keski-ikäisillä ja vanhemmilla potilailla, mutta sitä tavataan kaikissa ikäluokissa. Sairaus on hieman yleisempää miehillä kuin naisilla (2,3:1). (7)

### **1.2.3 Ependymooma WHO gradus II**

Ependymooma (WHO gradus II) on hitaasti kasvava lasten ja nuorten aikuisten aivokasvain. Kasvain on lähtöisin aivokammioiden seinämistä tai selkäydinkanavasta. Ependymoomakasvaimet ovat tyypillisesti pehmeitä, tarkkarajaisia tuumoreita. Nekroosia tai verenvuotoa ei yleensä ole havaittavissa. Ependymooma infiltroi vain harvoin ympäröiviin kudoksiin, mutta voi tukkia aivokammiot tai painaa aivorunkoa. (3)

Klassinen ependymooma on tarkkarajainen gliooma, jossa tumat ovat pyöreitä tai soikeita ja joissa tuman kromatiini on järjestäytyneenä hienojakoisesti. Mitoosit ovat erittäin harvinaisia, mihin sopii alhainen MIB-1-värjäytymisindeksi. Kasvaimessa voidaan nähdä sekä perivaskulaarisia pseudorosetteja että ependymaalisia rosetteja ja kanavia. Pseudoroseteissa solut ovat verisuonten ympärille radiaalisesti asettuneita. Ependymaaliset rosetit ja kanavat koostuvat lieriömäisistä soluista, jotka ovat järjestäytyneet lumenin ympärille. Kasvaimen verisuonet voivat hyalinisoitua, mikä edeltää niiden kalkkeutumista. Ependymooma gradus II voidaan jakaa histopatologisiin variantteihin, joista tärkeimpiä ovat sellulaarinen ependymooma, papillaarinen ependymooma, kirkassolu ependymooma ja tanysyyttinen ependymooma. (1)

### **1.2.4 Anaplastinen ependymooma**

Anaplastinen ependymooma (WHO gradus III) on ependymooman alatyypeistä pahanlaatuisin. Se kasvaa nopeasti ja eloonjäämisennuste on huono varsinkin lapsilla. Kasvaimelle tyypillistä on runsas solukkuus, sekä niiden voimakas mitoottinen aktiivisuus. Solut ovat useimmiten huonosti erilaistuneita. Verisuonten uudismuodostuksen ja nekroosin lisäksi anaplastisen ependymooman histologinen tunnusmerkki on myös perivaskulaariset pseudorosetit. Nekroosi ei yksinään ole merkki pahanlaatuisuudesta, jos verisuonten uudismuodostusta, lukuisia mitooseja tai korkeaa proliferaatioindeksiä ei kasvaimessa havaita (19, 15, 20). Tuumori säilyy usein tarkkarajaisena, mutta joissakin tapauksissa se leviää ja tunkeutuu ympäröiviin kudoksiin. Embryonaalisia kudoselementtejä tai ependymoplastisia rosetteja ei esiinny anaplastisessa ependymoomassa.



Ependymooman anaplastista muotoa tavataan eniten aivoissa ja varsinkin aivojen takakuopassa, mutta harvoin selkäytimessä. Anaplastinen ependymooma kasvaa nopeammin kuin graduksen II ependymooma ja voi aiheuttaa intrakraniaalisen paineen kasvua jo sairauden alkuvaiheessa. Magneettikuvissa näkyy kasvaimen kohdalla tyypillisesti ympäristöään tummempi massa. (1)

Ilmaantuvuustiedot vaihtelevat suuresti, sillä pahanlaatuisen anaplastisen ependymooman histologisia kriteerejä on vaikea määrittää tarkasti. Anaplastisia muutoksia tapahtuu yleisesti lapsuuden intrakraniaalisissa ependymoomissa, varsinkin aivojen takakuopan kasvaimissa. (7)

### 1.3 Ependymoomien molekyylipatologiaa

Useissa syövässä tunnetaan monia perinnöllisiä tekijöitä, jotka antavat tärkeää informaatiota syövän syntymekanismeista. Ependymoomista ei kuitenkaan tunneta kuin muutamia taustalla olevia geneettisiä tekijöitä ja harvoja familiaalisia syndroomia. On olemassa muutamia sukuja, joilla ilmenee paljon ependymoomaa, mutta joissa ei ole nykytiedossa olevaa familiaalista syöväälle altistavaa syndroomaa (1).

Spinaaliset ependymoomat ja vallitsevasti periytyvä sairaus neurofibromatoosi 2 (mutaatio kromosomin 22 *NF2*-geenissä) ovat yhteydessä toisiinsa. *NF2*-geeni liittyy ependymooman tuumorigeneesiin. Muihin periytyviin sairauksiin liittyvät ependymoomat ovat harvinaisia. (21)

Sytogeneettisistä muutoksista tärkein ependymoomiin yhdistetty tekijä on kromosomin 22 puutos (monosomia 22). Puutos on löytynyt jopa 30 %:lla tapauksista (22). Monosomia 22 ja 22q deleetio tai translokaatio ovat yleisempiä selkäytimen ependymoomissa kuin intrakraniaalisissa ependymoomissa. Yleisiä löydöksiä ovat myös kromosomien 6q tai 9q puutos (23). Monosomia 13 on raportoitu 8 tapauksessa, joista puolet oli pediatria potilaita (24).

39 ependymooman RNA-profiilitutkimuksessa ilmentyivät voimakkaasti insuliininkaltainen kasvutekijä 2 (*IGF2*), *RAF1* (rheumatoid artkritis factor1), matriksi metalloproteiini 12 (*MMP12*), prosaposiini (*PSAP*) ja *MSX1* (msh homeobox 1) (25). Geeniekspressioon vaikuttaa voimakkaasti ependymooman sijainti. Supratentoriaalisissa kasvaimissa ekspressoitui voimakkaasti efriniireseptori *B-* (*EPHB*), *NOTCH*-, *CYCLIN*- ja *CDK* (sykliinistä riippuvainen kinaasi)-perheet, kun taas selkäytimen ependymoomissa ekspressoituivat voimakkaasti monet *HOX* (homeobox)-perheen jäsenet. (25, 26)

## 1.4. Kliinispatologiset ennustetekijät

Aivokasvainpotilaan ennusteeseen vaikuttavat paitsi kasvaimen histologinen tyyppi ja gradus, myös potilaan ikä, kasvaimen sijainti, sen kasvunopeus sekä hoitovaste. Gradus II ependymooman eloonjäämisennuste on lapsilla usein huonompi kuin aikuisilla. Alle 2-vuotiaana sairastuneiden ennuste on erityisen huono. Huono ennuste saattaa johtua siitä, että lasten kasvaimet ovat yleensä aivojen takakuopassa ja aikuisten selkäytimessä. Nuoren ikäluokan kasvaimissa ilmenee useammin myös anaplastisia muutoksia. Aivorungon kasvaimilla on usein erittäin huono ennuste sekä lapsilla että aikuisilla.

Supratentoriaalisissa ependymoomissa on suurempi eloonjäämisen todennäköisyys kuin takakuopan neoplasmissa. Selkäytimen kasvaimissa on myös merkittävästi parempi ennuste kuin pikkuaivojen tuumoreissa, vaikka selkäytimen ependymoomat uusiutuvat helpommin. (27) Selkäytimen kasvaimet, myksopapillaariset ependymoomat ja subependymoomat voidaan yleensä poistaa radikaalisti, jolloin potilas paranee täysin. Leikkauksen jälkeinen eloonjäämisennuste on yli 10 vuotta. (28) Jos koko kasvaimen poisto ei onnistu leikkauksessa, on kasvaimen uusiutuminen ja etäpesäkkäiden muodostuminen mahdollista sekä aikuisilla että lapsilla. Subaraknoidaalista (lukinkalvonalaista) leviämistä on havaittu joissakin kasvaintapauksissa. Aikuisten korkeamman maligniteettiasteen glioomissa radikaaliin poistoon päästään harvoin ja hoitovaste säde- ja sytostaattihoidollekin on usein huono.

Kliinisissä tutkimuksissa havaittu korrelaatio anaplastisen kasvaimen histologian ja potilaan selviytymisennusteen välillä vaihtelee (29, 30, 31). Kahdessa yli 200 tapauksen tutkimuksessa ei havaittu korrelaatiota potilaan selviytymisen ja tuumorin pahanlaatuisten histopatologisten merkkien kanssa. Kuitenkin toisissa tutkimuksissa eloonjäämisennusteen todettiin korreloivan selvästi sellaisten kasvainten kanssa, joissa oli sekä runsassoluisuutta että paljon mitoottista aktiivisuutta (9) tai tiheää solukkuutta, verisuonten uudismuodostusta ja/tai sytologista atypiaa (32). Alle 3-vuotialla huonoa ennustetta on todettu lisäävän ei-radikaali kasvaimen poisto ja anaplastiset histologiset piirteet (33). Ependymoomissa (Gradus II) huonoon ennusteeseen korreloi mitoottinen aktiivisuus, proliferaatioindeksi, ja hypersellulaarisuus (15, 32).

## 1.5 Immunohistokemialliset ennustetekijät

### 1.5.1 MIB-1

Vuonna 1983 kuvattiin ensimmäistä kertaa Ki-67-vasta-aine, jota jakautuva solu alkaa ilmentää solusyklin S-vaiheen aikana (34). Ki-67-antigeeniekspressio lisääntyy S- ja G2-vaiheiden aikana ja niiden läpi, saavuttaen maksimipitoisuutensa mitoosissa, jossa solun jakautuminen lopulta tapahtuu. Ki-67:n ilmentyminen on heikkoa G1-vaiheessa ja S-vaiheen alussa, eikä sitä ilmennä solun ollessa lepotilassa G0-vaiheessa. Ki-67:n roolia solun jakautumisessa ei tunneta tarkasti, mutta se on havaittu hyväksi merkkiaineeksi solun proliferaatioaktiivisuuden osoittamisessa. Ki-67 ilmentyminen on usein voimakasta korkean graduksen kasvaimissa. (35)

MIB-1-vasta-ainevärjäyksellä on mahdollista tunnistaa soluproliferaatioon liittyvä Ki-67-proteiini formaliinifiksoidusta ja paraffiiniin valetusta kudoksesta mikroaaltouunikäsittelyn jälkeen (36). Vasta-ainevärjäystä käytetään yleisesti patologian laboratorioissa. MIB-1-proteiinin ilmenemistä on tutkittu paljon ja sitä pidetään tärkeänä aivokasvaimien ennustetekijänä. MIB-1-indeksi on luotettava histopatologinen biomarkkeri intrakraniaalisissa ependymoomissa (2). Monissa toisistaan riippumattomissa tutkimuksissa on havaittu merkittävä korrelaatio Ki-67-proliferaatioindeksin ja eloonjäämisennusteen välillä (30, 37, 38, 15). Ki-67:ää pidetään erään tutkimuksen mukaan jopa gradeerausta luotettavampana ennustetekijänä intrakraniaalisissa ependymoomissa (30). Korkea MIB-1-indeksi viittaa huonompaan ennusteeseen ja kasvaimen herkempään taipumukseen uusiutua.

### 1.5.2 Muut immunohistokemialliset ennustetekijät

Muista immunohistokemiallisesti määritettävistä molekyyleistä on ependymooman ennusteen todettu korreloivan *glial fibrillary acidic proteiinin* (GFAP) (39), sykliinistä riippuvaisen kinaasi-inhibiittori 2A:n (CDKN2A), tenaskiinin, epidermaalisen kasvutekijän (EGF) (40), proliferoivan solun tuma-antigeenin (PCNA) (41), sykliini D1:n, Bcl-2:n (B-solu lymfooma-geeni) (38) ja topoisomeraasi II alfan (42) kanssa. Muutamat tutkimukset ovat löytäneet yhteyden p53-immunoreaktiivisuuden ja huonon ennusteen välillä (32, 43, 41).

### 1.5.3 FGFR3

Fibroblastikasvutekijäreseptori (FGFR) -perhe koostuu neljästä jäsenestä, jotka liittyvät vammojen paranemiseen, angiogeneesiin, kudosten kehitykseen ja inflammaatioon. Reseptorit sisältävät solunulkoisen osan, jossa on kolme immunoglobuliininkaltaista osaa (Ig I-III), lyhyen solukalvon läpäisevän osan, sekä solunsisäisen tyrosiinikinaasiosan. (44) Fibroblastikasvutekijän kiinnittyminen solunulkoiseen osaan aiheuttaa reseptorin dimerisoitumisen ja solunsisäisten reseptoriosien tyrosiinifosforylaation. Aktivoitunut reseptorikompleksi fosforyloi ja aktivoi useita solun sisäisiä signaalintajajärjestelmiä. Tämän seurauksena aktivoituu solun kasvua edistävien geenien luenta. (45) FGF-ligandeja on tunnistettu ainakin 18 kappaletta (46). Reseptorin solunulkoisen Ig-III-osa voi käydä läpi vaihtoehdoisen silmukoinnin ja muodostaa Ig-IIIb ja Ig-IIIc isoformeja, joista ensimmäistä esiintyy epiteelissä ja jälkimmäistä mesenkyymissä. (47)

Fuusiogeenit ovat useista eri syöivistä löytyviä kromosomaalisia poikkeamia. Fuusiogeeni syntyy, kun kaksi erillään toimivaa geeniä järjestäytyy keskenään uudelleen ja muodostaa uuden hybridigeenin (48). Hybridigeeni voi muodostua usealla eri tavalla. Saman kromosomin sisällä tapahtuvat rekombinaatiot luokitellaan intrakromosomaalisiin ja eri kromosomien välillä tapahtuvat rekombinaatiot interkromosomaalisiin geenien uudelleenjärjestäytymisiin. Intrakromosomaaliset rekombinaatiot jaetaan vielä kahdentumiin, kääntymiin, deleetioihin ja siirtymiin (translokaatioihin). (49) FGFR-fuusiot tapahtuvat monista muista fuusioista poiketen lukuisten eri kudosten syöivissä. On vielä epäselvää, miksi esimerkiksi BCR:ää ja TMPRSS2:sta sisältäviä fuusioita on löytynyt vain verisyöivistä ja eturauhasen syöivistä, mutta FGFR-fuusioita tapahtuu laajemmin. (48)

Diagnosointimenetelmät fuusioposiitivisten potilaiden löytämiseksi vaihtelevat fuusion tyypistä riippuen. Translokaatiolla tapahtuvat fuusiot diagnosoidaan fluoresenssi *in situ*-hybridisaatiolla (FISH), mikä mahdollistaa epänormaalien kromosomien tunnistuksen soluista. Fuusiot, jotka johtavat toisen fuusiopartnerin yli-ilmenemiseen, voidaan diagnosoida mikrosiru-menetelmällä. Polymeraasiketjureaktiota (PCR) käytetään myös tunnistamisessa. Menetelmässä käytettävät kaksi aluketta on suunniteltu niin, että ne sopivat fuusiogeenin kanssa yhteen ja pariutuvat sen kanssa. PCR-tuotteet voidaan sen jälkeen sekvensoida. Jos molemmat fuusiogeenin partnerit löytyvät näytteestä, on näyte positiivinen. Epäsuorana menetelmänä voidaan käyttää myös Western-blotting-menetelmää, jossa muuntuneet proteiinit tunnistetaan hybridisaatiolla ja niiden kasvanut molekyylipaino arvioidaan suhteessa kontrolleihin. (48)

FGFR3:n onkogeenisia mekanismeja ovat mm. lisääntyneen signaalin aiheuttama muiden onkogeenien aktivaatio, mikro-RNA:n säätelyn alaisuudesta poistuminen ja promoottorialueiden vaihtaminen. Kolme tutkimusta raportoi FGFR3-TACC3 -fuusion aktivoivan *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)-signaalia (50, 51, 52). Myös FGFR3-BAIAP2L1 (*Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1*) ja FGFR3-CCDC6 (*Coiled-coil domain-containing protein 6*)-fuusiot, joissa oli sama eksonin (18) katkeamiskohta kuin FGFR3-TACC3-fuusiolla, aktivoivat ERK-signaalia (51, 52). Muista poiketen eräs tutkimus tosin myös raportoi fuusion inhiboivan ERK-signaalia (53). Saman tutkimuksen mukaan fuusion onkogeenisuus voi selittyä myös kromosomin epävakaisuutta suosimalla. Mikro-RNA:n säätelyn alaisuudesta poistuminen on myös mahdollista, ja sitä on havaittu FGFR3-TACC3- positiivisilla glioblastooma-potilalla. Normaleissa olosuhteissa miR-99a hiljentää geenin ilmenemistä sitoutumalla FGFR3:n 3'-pään transloittumattomalle alueelle (3' untranslated region, 3'-UTR), mikä johtaa mataliin FGFR3-tasoihin. FGFR3-TACC3-fuusio onnistuu välttämään miR-99a:n säätelyn, sillä fuusion transkriptista puuttuu FGFR3:n 3'-pää, UTR 3'-pään ollessa peräisin TACC3-geenistä. 3'-UTR:n puuttuminen mahdollistaa geenin yli-ilmenemisen. (50) Fuusiot voivat voimistaa onkogeenisten molekyylien signaalia myös promoottoria vaihtamalla, jolloin tietty geeni sijoittuu jonkin toisen, yleensä vahvan promoottorin säätelyn alaisuuteen. Promoottorin vaihto on tavallista eturauhassyövän fuusioissa. (54)

Myös mutaatiot voivat tehdä FGFR-geeneistä onkogeenisia. FGFR-reseptorit tarvitsevat normaaleissa olosuhteissa ligandin aktivoituakseen. Mutaatiot voivat tehdä reseptorista ligandi-riippumattoman, jolloin reseptori ei enää tarvitse ligandin tarjoamaa signaalia aktivoituakseen. FGFR3:n solunulkoista, ligandia sitovaa osaa aktivoivia mutaatioita on havaittu jopa puolella virtsarakon syövästä (55). Eräässä tutkimuksessa 20 prosentilla multipplel myeloomaa sairastavista potilaista havaittiin FGFR3-yli-ilmenemistä. (56)

## 1.6 Ependymoomien hoito

Lapsilla glioomat ovat usein matalan pahanlaatuisuusasteen eli gradus I–II kasvaimia. Näihin kuuluvat ependymooman alatyypit subependymooma, myxopapillaarinen ependymooma ja gradus II ependymoomat. Ainoa tarvittava hoito on tavallisesti kasvaimen neurokirurginen poisto ja sen onnistuminen on tärkein ennusteeseen vaikuttava tekijä sekä lapsilla että aikuisilla. Koko kasvaimen poisto on mahdollista 40–60 prosentilla potilaista. Puolella lapsipotilaista tauti uusiutuu kahden

vuoden kuluessa (57). Sätehoidosta on hyötyä, jos kasvain on levinnyt laajalle alueelle, se on sädeherkkä, jos kasvaimen poisto ei onnistunut tyydyttävästi (4) tai jos sädehoitoa annetaan lapsipotilaille alle 150 päivän sisällä diagnoosista (58). Suositeltu annos on gradus I-II kasvaimille 45–54 Gy ja graduksen III anaplastisille ependymoomille 54–60 Gy (4). Leikkauksen jälkeen annettu 54–59 Gy:n sädehoito on parantanut kokonaiseloonjäämisosuutta 50 prosentista jopa 85 prosenttiin (29).

Solunsalpaajahoidon osuus taudin hoidossa ei ole merkittävä ja sen tarkoituksena on usein siirtää pienten lasten sädehoidon aloitusajankohtaa (59). Jos kasvainta ei voitu poistaa riittävästi, potilaalla on kliinisiä oireita tai tuumorin kasvu on aggressiivista, voidaan ensisijaisena jatkohoitona käyttää solunsalpaajalääkitystä pienillä lapsilla ja tyypin 1 neurofibromatoosia (NF1) sairastavilla potilailla. Tavallisin nykyään käytössä oleva lääkeyhdistelmä sisältää vinkristiiniä ja karboplatiinia. (60)

## **1.7 Tutkimuksen tavoitteet**

Tutkimuksen tavoitteena on selvittää ependymoomissa

1. Kliinispatologisten ennustetekijöiden merkitystä
2. Immunohistokemiallisten ennustetekijöiden, erityisesti Ki-67:n ja FGFR3:n merkitystä
3. Näiden keskinäisiä korrelaatioita

## **2 AINEISTO JA MENETELMÄT**

### **2.1 Potilasaineisto**

Potilaat on leikattu 1.1.1979–31.12.2009 välisenä aikana Tampereen (TAYS), Kuopion (KYS) ja Turun (TYKS) yliopistollisissa sairaaloissa.

Ependymoomanäytteitä on yhteensä 112 kappaletta (mukana primaarit ja residiiivit) 89:stä eri potilastapauksesta. 89 potilaasta 77:stä on tutkittavana primaarituumori ja 12:sta vain residiivituumori. Residiivituumoreita on koko aineistossa yhteensä 35 kappaletta, joista saman potilaan sekundaarisia kasvaimia on 14 kappaletta, kolmansia residiivikasvaimia 14 kappaletta, neljänsiä 3 kappaletta, viidensiiä 2 kappaletta ja kuudensiiä 2 kappaletta.

Gradus I tuumoreita on tutkittavana 19 kappaletta, gradus II tuumoreita 70 kappaletta ja gradus III tuumoreita 23 kappaletta.

Ependymoomanäytteet jakautuvat eri alatyyppeihin seuraavasti: ependymoomia (gradus II) on 70 kappaletta (62 %), anaplastisia ependymoomia (gradus III) 23 kappaletta (21 %), myksopapillaarisia ependymoomia (gradus I) 17 kappaletta (15 %) ja subependymoomia (gradus I) 2 kappaletta (2 %).

Sukupuoli- ja ikäjakauma ovat lähes tasan sukupuolten kesken. Potilastapauksista 58 (52 %) on miehiä ja 54 (48 %) naisia. Aineiston potilaiden keski-ikä on 34 vuotta. Naisten keski-ikä on aineistossa leikkaushetkellä 35 vuotta ja miesten 34 vuotta. Nuorin ependymoomaan sairastunut potilas on alle 1-vuotias ja vanhin 77-vuotias.

Seuranta-aika TAYS:ssa (tapauksia 44) oli elossa olevilla ensimmäisestä kasvaindiagnoosista viimeiseen seurantahetkeen vähintään 39 kuukautta (3 vuotta), enintään 307 kuukautta (26 vuotta) ja keskimäärin 144 kuukautta ( $12 \pm 6$  vuotta). KYS:ssä (tapauksia 14) seuranta-aika oli vähintään 46 kuukautta (4 vuotta), enintään 285 kuukautta (24 vuotta) ja keskimäärin 138 kuukautta ( $12 \pm 6$  vuotta). TYKS:ssä (tapauksia 4) seuranta-aika oli vähintään 39 kuukautta (3 vuotta), enintään 131 kuukautta (11 vuotta) ja keskimäärin 93 kuukautta ( $8 \pm 4$  vuotta). TAYS:n potilaiden nykyhetken tiedot on päivitetty 1.2.2014

Primaarikasvaintapausten tautivapaa seuranta-aika, joka on aika ensimmäisestä diagnoosista tuumorin uusiutumiseen tai potilaan kuolemaan, oli vähintään 0 kuukautta, enintään 176 kuukautta (15 vuotta) ja keskimäärin 37 kuukautta ( $3 \pm 4$  vuotta).

## **2.2 Immunohistokemialliset menetelmät**

### **2.2.1 MIB-1 menetelmät A ja B**

MIB-1-värjäykset suoritettiin Fimlab Oy:n patologian laboratoriossa. Kaikissa kasvainten värjäyksissä formaliinifiksoiduista ja paraffiiniin pedatuista kudosplokeista leikattiin noin 5 mikrometrin paksuiset leikkeet.

Ensimmäisessä menetelmässä (MIB-1-menetelmä A) histologisia leikkeitä kiinnitettiin tunnin ajan 56 C:ssa lämpölevyllä, jonka jälkeen ne deparaffinoitiin xyleenillä ja rehydroitiin alkoholisarjassa. Lopuksi ne esikäsiteltiin 9,0 pH:n Tris-EDTA-puskurissa mikroaaltouunissa. Leikkeiden värjäykset suoritettiin Techmate TM 500 Plus-automaatilla (Dako, Denmark) ENVP-ohjelmalla.

Primaarivasta-aineena käytettiin 1:110 laimennussuhteen MIB-1:tä (Dako, Denmark). Positiivinen MIB-1-värjäytyminen osoitettiin Envision-detektiokitillä. CAS-200- kuva-analyysiä varten tumat värjättiin 0,03-prosenttisella metyyliivihreällä, joka osoitti näytteiden MIB-1-negatiiviset tumat.

Toisessa menetelmässä (MIB-1-menetelmä B) deparaffinointi, rehydraatio, esikäsitely ja värjääminen tapahtuivat koneellisesti Bond Max-automaatissa (Leica Microsystems, USA). MIB-1-laimennos oli 1:200 ja positiivinen värjäytyminen osoitettiin detektiokitillä, joka tunnistaa primaarivasta-aineen ja reagoi diaminobentsidiinin (DAB) kanssa. Negatiivinen tumaväri osoitettiin minuutin kestäväällä laimentamattomalla hematoksyliini-käsittelyllä, joka sai aikaan tumien värjäytymisen siniseksi.

Molemmissa menetelmissä (A ja B) polymeeriset detektiokitit (Techmatella Envision-kitti, Bond Maxin oma Polymer Refine Detection-kitti) toimivat samalla periaatteella: primaarivasta-aineinkubaation jälkeen näytettä inkuboidaan kitillä, jossa primaarivasta-aine tunnistetaan HRP-konjugoidulla antihiiri+antikanivasta-aineella. HRP-konjugoitu vasta-aine taas reagoi DAB:in kanssa, joka muodostaa ruskean sakan vasta-ainekohtaan.

### **2.2.2 MIB-1-värjäysten kuva-analyysi**

Menetelmässä A CAS-200-kuva-analyysilaitte tunnistaa MIB-1-antigeenilla värjäytyneet tumat niiden muotoa ja kokoa arvioivien matemaattisten yhtälöiden perusteella. Laite koostuu mikroskoopista, kahdesta kamerasta, jotka rekisteröivät kahden eri värin aallonpituuksia sekä



tietokoneesta. Toinen kameroista tunnistaa aallonpituuden perusteella ruskealla värillä värjäytyneet MIB-1-positiiviset tumat ja toinen kameroista vihreällä värjäytyneet MIB-1-negatiiviset tumat. Laite antaa MIB-1-pinta-alaindeksin prosentteina: positiivisten tumien pinta-alaosuus jaetaan koko tumapinta-alaosuudella (proliferaatioprosentti).

Menetelmässä B käytettiin ImmunoRatio-analyysiä. ImmunoRatio-ohjelmalla analysoiminen vaatii analysoitavan näytteen siirtämistä tietokoneelle. Objektilasilla oleva kudoslleike skannattiin kokonaisuudessaan pienellä suurennoksella tietokoneelle. Tämä mahdollistaa näytteen tarkastelun tietokoneen ruudulta erilaisilla suurennoksilla tavallisen mikroskoopin käytön tapaan. Tässä tutkimuksessa skannaamiseen käytettiin Scanscope XT (Aperio)-virtuaalimikroskooppilaitetta. ImmunoRatio-ohjelmaan perustuva kuva-analyysi suoritettiin monikudosblokin kudoslleiriöistä siten, että määritettiin koko kudoslleiriön alan mittaus proliferaatioindeksin mittauksessa (200-kertainen suurennos).

ImmunoRatio-ohjelma analysoi lopuksi näytekuvan laskemalla positiivisesti värjäytyneiden tumien pinta-alaosuuden koko tumapinta-alasta, ja antaa tuloksen proliferaatioprosentteina. Vastaus saadaan kuvana, jossa näkyvät sekä alkuperäinen kuva näytteestä että analysoitu kuva.

### **2.2.3 FGFR3-värjäys ja analyysi**

Paraffiini poistettiin joko ksyleenillä tai heksaanilla, jonka jälkeen tapahtui näytteiden rehydraatio etanolissa. Esikäsittelyvaihe tehtiin Target Retrieval Solution 1x laimennetulla sitraattipuskurilla (Dako) mikroaaltouunissa. Vasta-aineena käytettiin hiiren anti-FGFR3-vasta-ainetta, jonka laimennussuhde oli 1:400 (sc-13121, Santa Cruz Biotechnology). Spesifiset reaktiokitit vasta-aineelle olivat Envision+System-horseradish peroksidaasi ja diaminobentsidiini (DAB). Tumat värjättiin manuaalisesti hematoksyleenillä. Monikudosblokkien immunohistokemiallisten FGFR3-tumavärjäysten intensiteetit määrittelivät kaksi havainnoitsijaa asteikolle 0–3 seuraavasti: 0, ei värjäytynyt; 1, hennosti värjäytynyt; 2, kohtalaisesti värjäytynyt ja 3, voimakkaasti värjäytynyt.

## 2.3 Tilastolliset menetelmät

Analyysit suoritettiin IBM SPSS Statistics 21.0 (SPSS Inc, Chicago, Illinois) ohjelmalla.

Analyysissä käytettiin seuraavia testejä: Mann-Whitneyn U, Chi-neliö, Kruskal-Wallis, Coxin monimuuttujamalli ja T-testi. Log-rank-testiä käytettiin ennustemuuttujien analysoinnissa.

Tilastollisesti merkittävä tulos sai arvon  $p < 0,050$ .

## 3 TULOKSET

### 3.1 Kliinispatologisten muuttujien keskinäiset suhteet

Histologiset tyypit jakautuvat neljään eri alatyyppiin: Ependymoomat, gradus II (tässä tutkimuksessa  $N = 70$ , 62 %); anaplastiset ependymoomat, gradus III ( $N = 23$ , 21 %); myksopapillaariset ependymoomat, gradus I ( $N = 17$ , 15 %); subependymoomat, gradus I ( $N = 2$ , 2 %).

Kasvainten sijainti eli topografia (selkäydin/pikkuaivot/isoaivot) korreloi merkittävästi graduksen kanssa ( $p = 0,000$ , Chi-neliötesti; **Taulukko 1**). Gradus II ependymoomaa esiintyy lähes yhtä paljon selkäytimessä ja aivoissa, mutta graduksen III anaplastista ependymoomaa enemmän pikkuaivoissa ja isoaivoissa ja myksopapillaarista (gradus I) ependymoomaa selkäytimessä (**Taulukko 1**).

**Taulukko 1.** Graduksen korrelaatio kasvaimen topografiaan. (Chi-neliötesti)

	Gradus N (%)			Total N (%)	p-arvo
	1	2	3		
<b>Topografia</b>					
Selkäydin	17 (37,8)	27 (60,0)	1 (2,2)	45 (100)	
Pikkuaivot	1 (3,6)	21 (75,0)	6 (21,4)	28 (100)	
Isoaivot	1 (2,7)	21 (56,8)	15 (40,5)	37 (100)	0,000
<b>Yhteensä</b>	19 (100)	69 (100)	22 (100)	112 (100)	

Sukupuolella ei havaittu olevan tilastollista yhteyttä muiden kliinispatologisten muuttujien kanssa. Kun tutkittiin sukupuolten korrelaatiota endymoomien eri graduksiin, ei merkittävää eroa havaittu sukupuolten välillä ( $p = 0,307$ , Chi-neliötesti). Topografia ja histologinen tyyppi eivät korreloi myöskään sukupuoleen.

Iän ja tuumorin histologisen tyypin välillä on merkittävä yhteys, kun henkilöt on jaettu lapsiin/nuoriin (0–19-vuotiaat) ja aikuisiin (yli 20-vuotiaat) ( $p = 0,021$ , Chi-neliötesti). Alle 19-vuotiaat sairastuvat yli 20-vuotiaita useammin anaplastiseen endymoomaan. Yli 20-vuotiaille on tyypillisempää sairastuminen gradus II endymoomaan ja myksopapillaariseen endymoomaan. Ikä korreloi histologisen tyypin kanssa merkittävästi myös silloin ( $p = 0,040$ , Chi-neliötesti), kun henkilöiden iät on jaoteltu kolmeen kategoriaan: 0–19-vuotiaat, 19–54-vuotiaat ja 55-vuotiaat ja vanhemmat. Tulos histologisen tyypin osalta on samankaltainen kuin edeltävässä ikäjaottelussa.

Ikä korreloi graduksen kanssa, kun ikä on jaoteltu edellä mainittuun kolmeen ryhmään ( $p = 0,010$ , Chi-neliötesti) sekä kun ikä on jaoteltu alle 19-vuotiaisiin ja yli 20-vuotiaisiin ( $p = 0,002$ , Chi-neliötesti). Alle 19-vuotiailla todetaan useammin graduksen II ja III kasvaimia, kun taas vanhemmille tyypillisempää ovat graduksen I ja II tuumorit.

Kasvaimen sijainnin ja kolmijakoisen ikäkategorian välillä voidaan havaita merkitsevä yhteys, kun kasvaimet on jaoteltu selkäytimen ja aivojen tuumoreihin ( $p = 0,011$ , Chi-neliötesti) sekä kun topografia on jaoteltu selkäytimen, pikkuaivojen ja iso-aivojen tuumoreihin ( $p = 0,010$ , Chi-neliötesti). Alle 19-vuotiailla ilmenee enemmän kasvaimia iso- ja pikkuaivoissa, vanhemmilla sen sijaan selkäytimessä.

### 3.2 MIB-1-värjäysanalyysit

Kahden MIB-1-värjäysanalyysin (A ja B) välillä oli kohtalainen toistettavuus, kun korrelaatiota tutkittiin Pearsonin korrelaatiokertoimen avulla ( $r = 0,495$ ;  $p = 0,086$ ), mutta kahdella eri metodilla tutkittuja kasvaimia oli vähän ( $N = 13$ ). MIB-1 A-värjäyksiä oli aineistossa 42 kappaletta ja MIB-1-B-värjäyksiä 65 kappaletta.

Kasvaimen histologinen tyyppi korreloi merkittävästi MIB-1 B-värjäysanalyysin kanssa ( $p = 0,036$ , Kruskal-Wallis-testi; **Taulukko 2**). Anaplastisten ependymoomien MIB-1-proliferaatioindeksin mediaani ja keskiarvo ovat suurempia kuin muilla ependymooman alatyypeillä.

Graduksen ja MIB-1:n välillä on merkittävä korrelaatio MIB-1 B-värjäysanalyysillä ( $p = 0,036$ , Kruskal-Wallis-testi; **Taulukko 2**), mutta ei MIB-1 A-värjäyksellä. Graduksen III MIB-1 B-proliferaatioindeksin keskiarvo ja mediaani ovat korkeampia kuin graduksilla I ja II.

Kasvaimen sijainti ei korreloi merkittävästi kummankaan MIB-1-värjäysanalyysin kanssa. MIB-1 B-analyysissä isoaivojen kasvaimien proliferaatioindeksi on korkein ja selkäytimen kasvaimien matalin, mutta tilastollista eroa ei havaita. (**Taulukko 2**)

FGFR3:n ja MIB-1-värjäysten välillä ei havaittu merkittävää yhteyttä kun FGFR3 on jaoteltu ei-värjäytyneisiin (0), hennosti värjäytyneisiin (1), kohtalaisesti värjäytyneisiin (2) ja voimakkaasti värjäytyneisiin (3) (Kruskal-Wallis-testi; **Taulukko 2**). Kun FGFR3 on jaoteltu negatiivisesti (0 = 0) ja positiivisesti värjäytyneisiin ( $1-3 = 1$ ) tuumoreihin, voidaan kuitenkin havaita, että FGFR3-positiivisten tuumoreiden MIB-1-värjäytymisindeksi näyttää olevan korkeampi kuin FGFR3-negatiivisten. Tulos on sama molemmilla MIB-1-värjäyksillä, mutta tulos ei ole tilastollisesti merkittävä (Mann-Whitney U-testi; **Taulukko 2**).

**Taulukko 2.** MIB-1-värjäysten yhteys kasvaimen histologiseen tyyppiin, gradukseen, topografiaan ja FGFR3-värjäytyvyyteen (keskiarvo, SD, mediaani). MIB-1 B-analyysi on tehty ImmunoRatiolla, MIB-1 A-analyysi CAS-200:lla. (Kruskal-Wallis-testi; kaksiarvoinen FGFR3 analyysi Mann-Whitney U-testi)

	MIB-1 B	p - arvo	MIB-1 A	p-arvo
<b>Histologinen tyyppi</b>				
Myksopapillaarinen ependymooma	4,8 ± 4,3 (2,0)		6,3 ± 1,5 (0,2)	
Ependymooma	4,7 ± 7,0 (3,0)		3,2 ± 5,6 (0,7)	
Anaplastinen ependymooma	13,6 ± 10,8 (13,0)	0,036	6,3 ± 6 (3,2)	n.s.
<b>Gradus</b>				
1	4,8 ± 4,3 (2,0)		1,0 ± 1,4 (0,2)	
2	4,7 ± 7,0 (3,0)		3,0 ± 5,4 (0,7)	
3	13,6 ± 10,8 (13,0)	0,036	6,8 ± 6,0 (3,4)	n.s.
<b>Topografia</b>				
Selkäydin	3,8 ± 3,5 (2,0)		1,1 ± 1,3 (0,6)	
Pikkuaivot	7,6 ± 8,2 (4,0)		4,7 ± 7,1 (0,8)	
Isoaivot	10,4 ± 11,5 (6,0)	n.s.	4,7 ± 5,7 (2,3)	n.s.
<b>FGFR3</b>				
0 = Ei värjäytynyt	4,8 ± 4,3 (4,0)		4,5 ± 6,5 (1,8)	
1 = Hennosti värjäytynyt	4,5 ± 3,6 (3,0)		9,4 ± 11,4 (5,3)	
2 = Kohtalaisesti värjäytynyt	12,3 ± 13,4 (11,0)		7,7 ± 6,7 (5,9)	
3 = Voimakkaasti värjäytynyt	2,0 ± 1,4 (2,0)	n.s.		n.s.
<b>FGFR3</b>				
0 = Negatiivinen	4,8 ± 4,3 (3,0)		4,5 ± 6,5 (1,8)	
1–3 = Positiivinen	7,1 ± 9,1 (3,0)	n.s.	9,5 ± 8,5 (5,5)	n.s.

### 3.3 FGFR3-värjäysanalyysi

Histologinen tyyppi korreloi merkittävästi FGFR3:n kanssa, kun FGFR3 on jaoteltu negatiivisiin ja positiivisiin tapauksiin ( $p = 0,041$ , Chi-neliötesti; **Taulukko 3**). Myksopapillaarisen ependymooman FGFR3 on useimmiten negatiivinen, gradus II ependymooman FGFR3 positiivinen.

Graduksen ja FGFR3:n välillä voidaan havaita merkittävä yhteys ( $p = 0,041$ , Chi-neliötesti; **Taulukko 3**). Graduksen II kasvaimien FGFR3-värjäytyminen on useimmiten positiivista. Graduksen I kasvaimet eivät värjäytyneet lainkaan. Gradus III kasvainten värjäytyminen jakautuu lähes tasan negatiivisiin ja positiivisiin värjäytymisiin.

Selkäytimen kasvaimet eivät useimmiten ilmennä FGFR3:sta, mutta muualla olevat kasvaimet ilmentävät. Kasvaimen sijainti ja FGFR3 korreloivat merkittävästi keskenään ( $p = 0,002$ , Chi-neliötesti; **Taulukko 3**).

Alle 19-vuotiaiden ja yli 55-vuotiaiden kasvaimissa FGFR3 on enemmän positiivinen, 20–54-vuotiailla enemmän negatiivinen. Kolmijakoinen ikäkattegoria (0–19, 20–54, 55-vuotiaat ja vanhemmat) korreloi siis merkitsevästi tuumorin FGFR3-ekspression kanssa ( $p = 0,016$ , Chi-neliötesti; **Taulukko 3**).

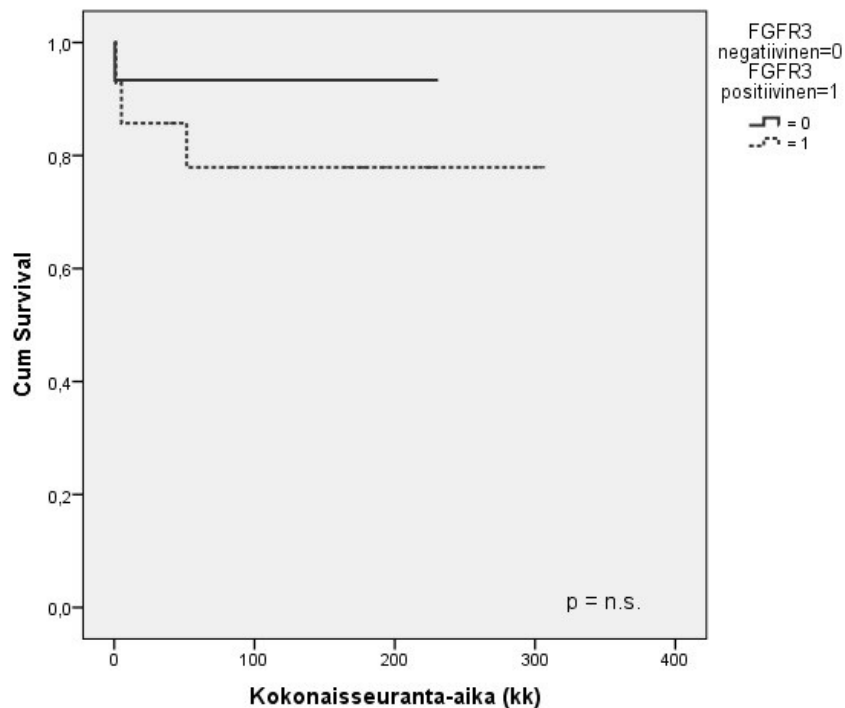
**Taulukko 3.** FGFR3-värjäytymisen yhteys kliinispatologisiin tekijöihin. Ryhminä FGFR3-negatiiviset (FGFR3-värjäytyminen = 0) JA FGFR3-positiiviset (FGFR3-värjäytyminen = 1–3). (Chi-neliötesti)

	FGFR3-, N(%)	FGFR3+, N(%)	Total N(%)	p - arvo
<b>Histologinen tyyppi</b>				
Myksopapillaarinen ependymooma	5 (100)	0 (0)	5 (100)	
Ependymooma	11 (39)	17 (61)	28 (100)	
Anaplastinen ependymooma	5 (56)	4 (44)	9 (100)	
<b>Yhteensä</b>	21 (50)	21 (50)	42 (100)	0,041
<b>Gradus</b>				
1	5 (100)	0 (0)	5 (100)	
2	11 (39)	17 (61)	28 (100)	
3	5 (56)	4 (44)	9 (100)	
<b>Yhteensä</b>	21 (50)	21 (50)	42 (100)	0,041
<b>Kasvaimen sijainti</b>				
Selkäydin	13 (87)	2 (13)	15 (100)	
Pikkuaivot	2 (25)	6 (75)	8 (100)	
Isoaivot	5 (29)	12 (71)	17 (100)	
<b>Yhteensä</b>	20 (50)	20 (50)	40 (100)	0,002
<b>Ikäkatgoria (ikä vuosina)</b>				
0–19	6 (35)	11 (65)	17 (100)	
20–54	13 (77)	4 (23)	17 (100)	
≥ 55	2 (25)	6 (75)	8 (100)	
<b>Yhteensä</b>	21 (50)	21 (50)	42 (100)	0,016

### 3.4 Kokonaisseuranta-aika ja tautivapaa seuranta-aika

#### 3.4.1 Kokonaisseuranta-aika

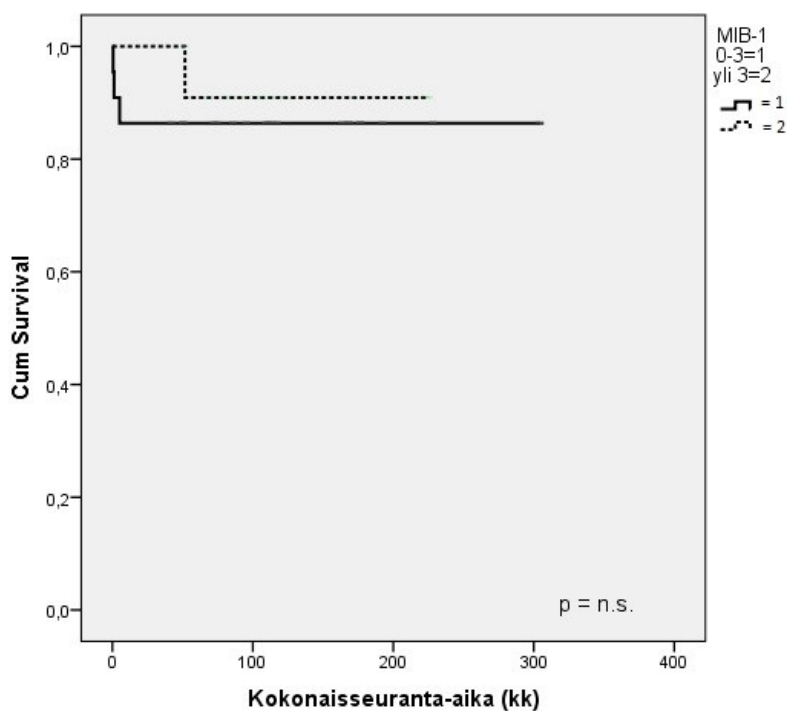
Eloonjääminen ei korreloinut merkittävästi graduksen, histologisen tyypin, sukupuolen, ikäkategorioiden (ryhminä 0–19, 20–54 ja 55-vuotiaat ja vanhemmat) eikä FGFR3:n (ryhminä negatiiviset ja positiiviset arvot) kanssa. **Kuvasta 1** kuitenkin voi havaita, että potilailla, joiden kasvaimet eivät ilmentäneet FGFR3:sta, on suurempi todennäköisyys elää pidempään diagnoosin jälkeen. (Kaplan-Meyer-käyrät, Log-rank-testi)



**Kuva 1.** Kokonaisseuranta-aika FGFR3-negatiivisilla ja -positiivisilla potilailla. (p = n.s., Log-rank-testi)

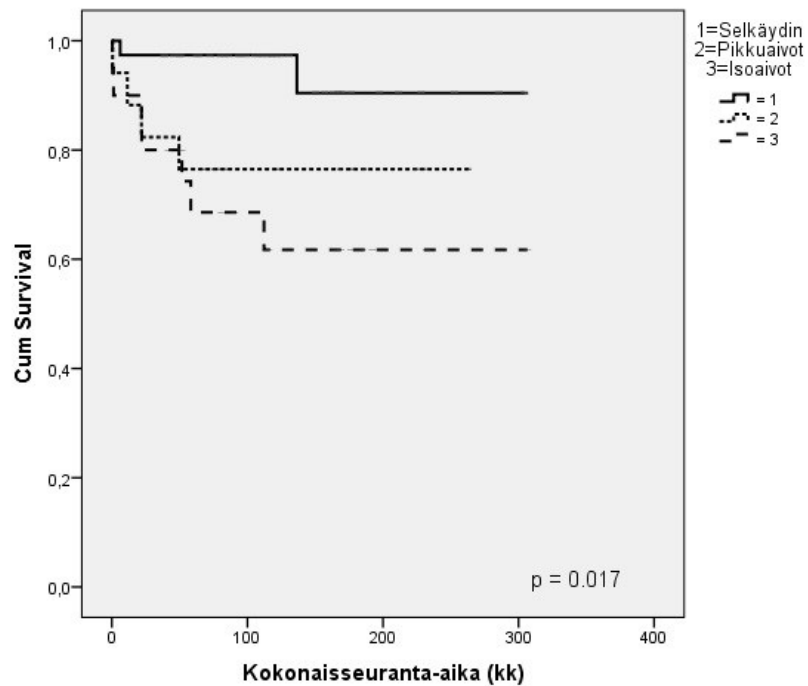


MIB-1-värjäysanalyysi ei korreloinut kokonaisseuranta-ajan kanssa. Kaplan-Meyer-käyrät ja Log-rank-testi tehtiin MIB-1 B-analyysin tuloksista. Tulokset jaettiin kahteen ryhmään mediaanin perusteella (1 ryhmä = 1–3 %, 2 ryhmä = yli 3 %). (**Kuva 2**)

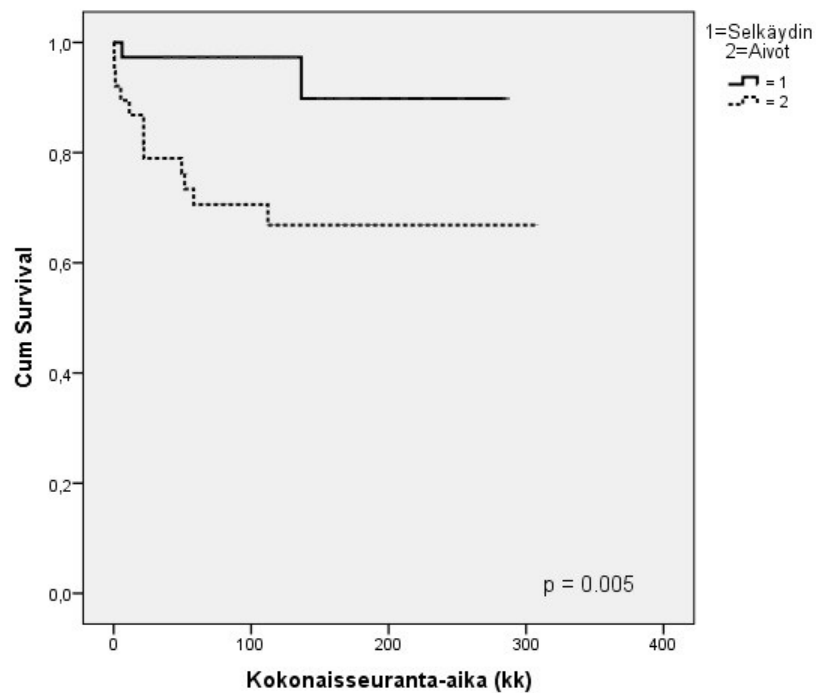


**Kuva 2.** Kokonaisseuranta-aika MIB-1 B-värjäysanalyysin perusteella.  
( p = n.s., Log-rank-testi)

Korrelaatio voidaan todeta kasvaimen sijainnin ja kokonaisseuranta-ajan välillä, kun topografia jaettiin selkäytimen, pikkuaivojen ja isoaivojen kasvaimiin (p = 0,017, Kaplan-Meyer-käyrät, Log-rank-testi; **Kuva 3**). Vielä merkittävämpi ero saatiin, kun kasvaimen sijainti on jaettu selkäytimen ja aivojen tuumoreihin (p = 0,005, Kaplan-Meyer-käyrät, Log-rank-testi; **Kuva 4**). Selkäytimen kasvaimissa eloonjäämisennuste on paras, isoaivojen kasvaimissa ennuste on huonoin.



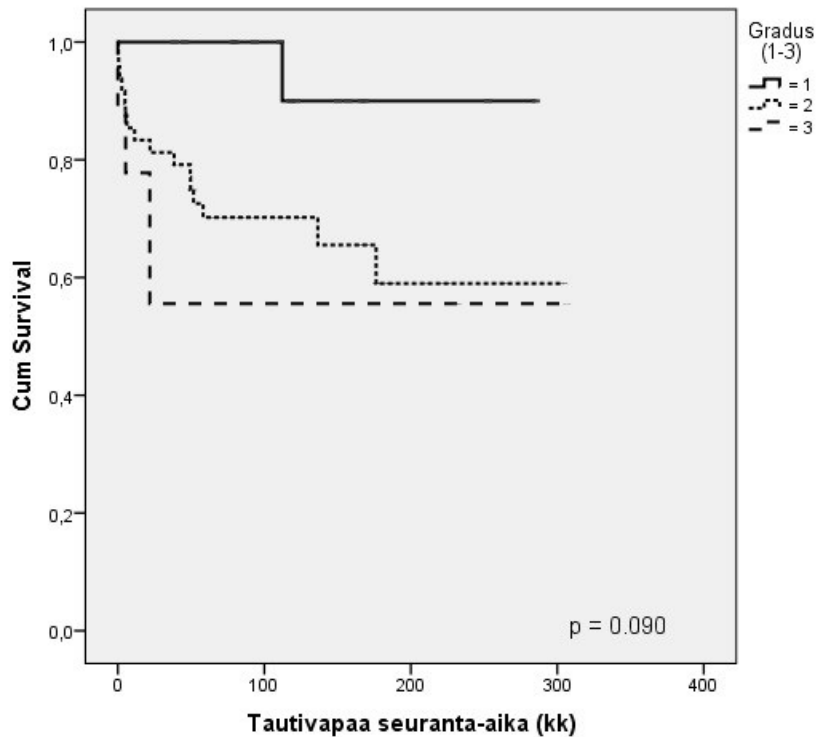
**Kuva 3.** Kokonaisseuranta-aika tuumorin sijainnin ollessa selkäydin, pikkuaivot tai isoivot. ( $p = 0,017$ , Log-rank-testi)



**Kuva 4.** Kokonaisseuranta-aika tuumorin sijainnin ollessa selkäydin tai aivot. ( $p = 0,005$ , Log-rank-testi)

### 3.4.2 Tautivapaa seuranta-aika

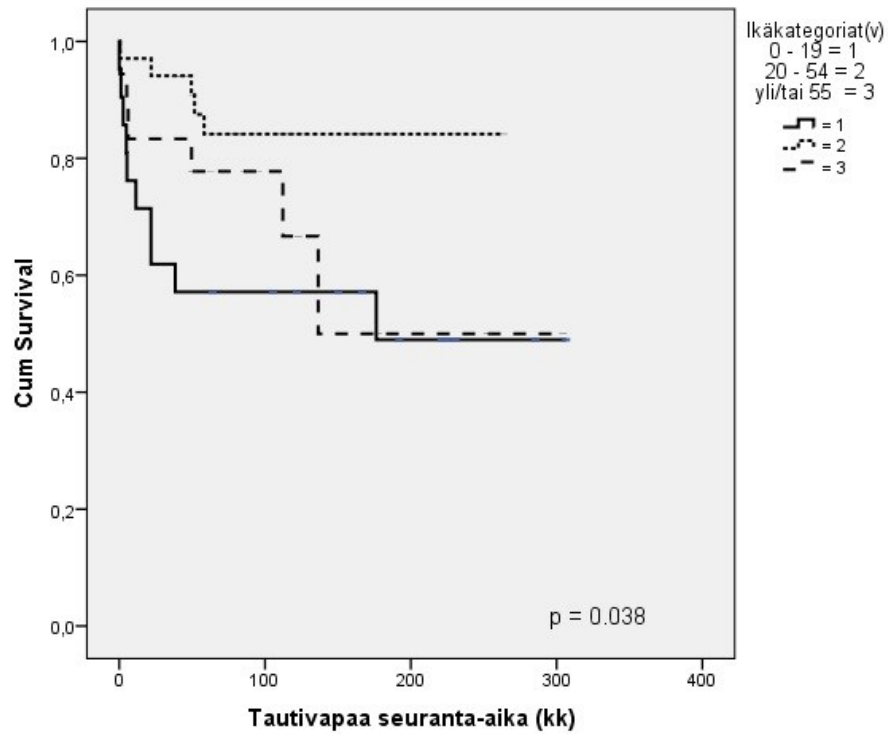
Histologinen tyyppi ja sukupuoli eivät korreloineet tautivapaan seuranta-ajan kanssa. **Kuvasta 5** voi nähdä, että korkeamman graduksen kasvaimilla on suurempi mahdollisuus uusua, mutta tulos ei kuitenkaan ole tilastollisesti merkittävä ( $p = 0,090$ , Kaplan-Meyer käyrät, Log-rank-testi).



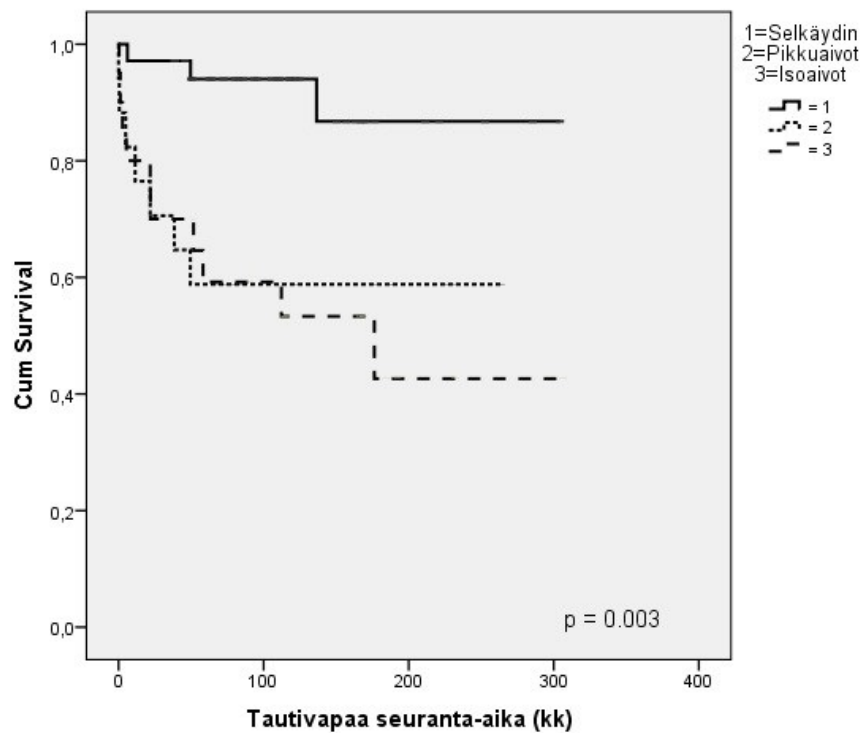
**Kuva 5.** Tautivapaa seuranta-aika eri gradusten perusteella.  
( $p = 0,090$ , Log-rank-testi)

Korrelaatio on kuitenkin merkittävä ikäkategorioiden (0–19, 20–54 ja 55-vuotiaat ja vanhemmat) välillä ( $p = 0,037$ , Kaplan-Meyer käyrät, Log-rank; **Kuva 6**). 20–54-vuotiaat saavat kahta muuta ikäluokkaa harvemmin residiiivikasvaimen.

Kasvaimen sijainti vaikuttaa merkittävästi sen uusimiseen, kun tuumorit on jaettu selkäytimen, isoaivojen ja pikkuaivojen kasvaimiin ( $p = 0,004$ , Kaplan-Meyer, Log-rank; **Kuva 7**)

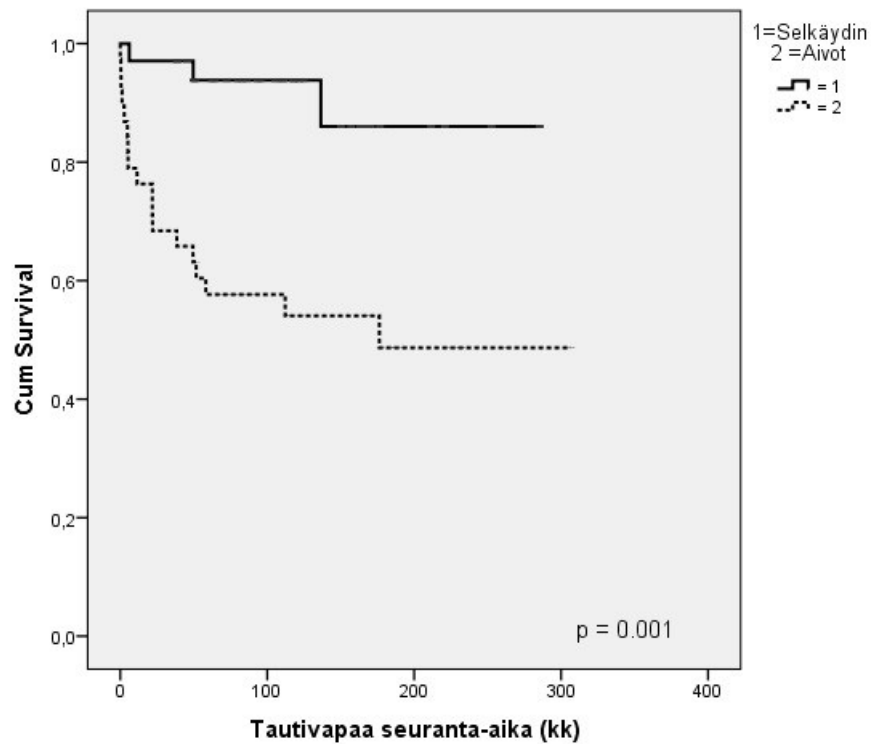


**Kuva 6.** Tautivapaa seuranta-aika eri ikäkatgorioissa. (p = 0,038, Log-rank-testi)



**Kuva 7.** Tautivapaa seuranta-aika kasvaimen sijainnin ollessa selkäydin, pikkuaivot tai isoivot. (p = 0,003, Log-rank-testi)

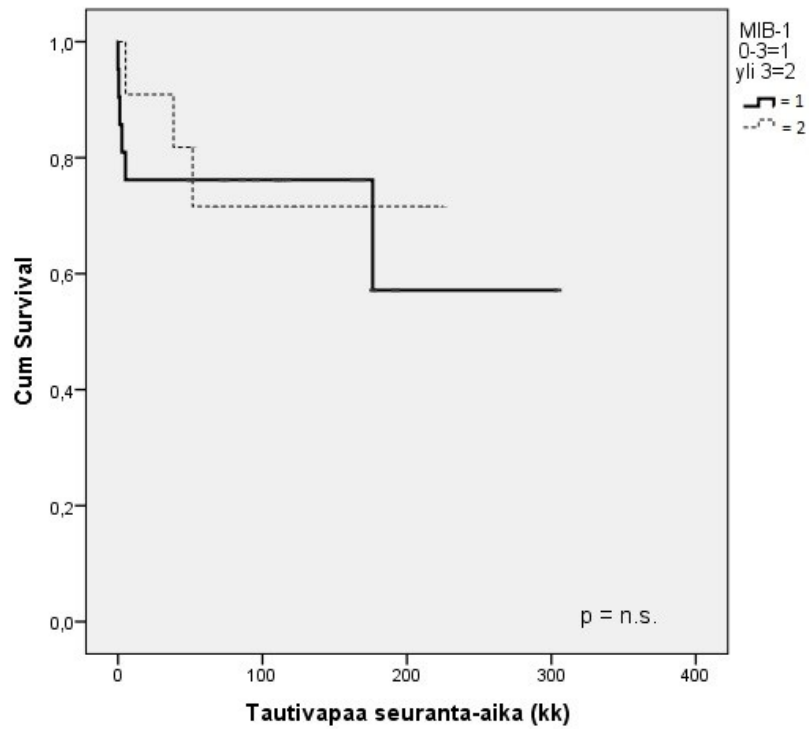
Kun tuumorit on jaettu kahteen ryhmään selkäytimen ja aivojen kasvaimiin, on korrelaatio vielä voimakkaampi ( $p = 0,001$ , Kaplan-Meyer-käyrät, Log-rank-testi, **Kuva 8**). Selkäytimen tuumorit uusivat harvemmin kuin iso- ja pikkuaivojen tuumorit.



**Kuva 8.** Tautivapaa seuranta-aika kasvaimen sijainnin ollessa selkäydin tai aivot. ( $p = 0,001$ , Log-rank)

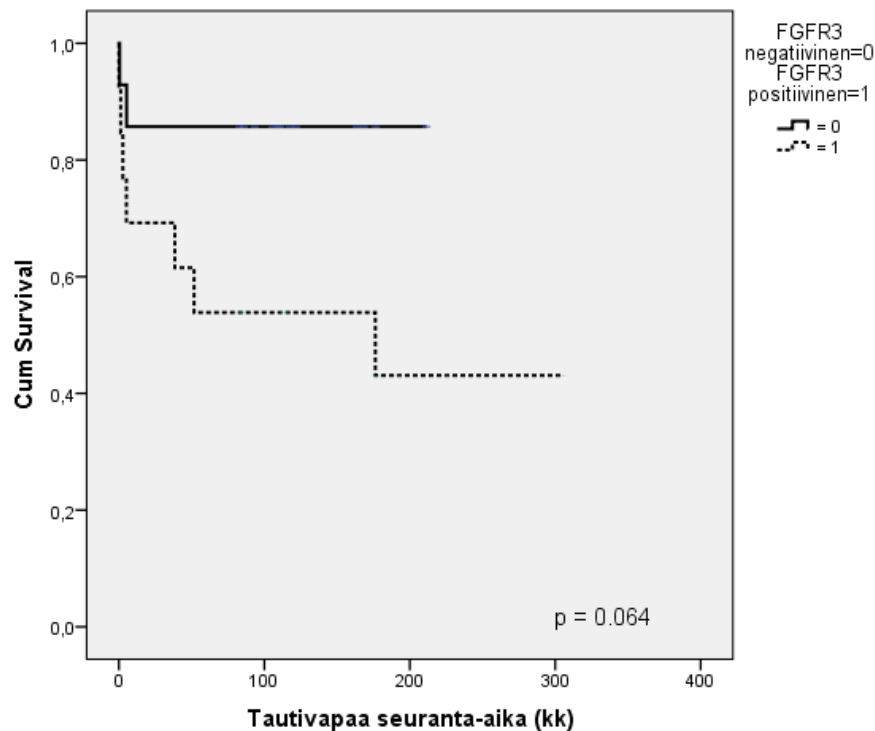
MIB-1 B -proliferaatioindeksin ja tautivapaan seuranta-ajan välillä ei ole merkittävää yhteyttä.

Tässäkin testissä jako kahteen ryhmään (0–3 % = 1, yli 3 % = 2) tehtiin mediaaniarvojen perusteella (Kaplan-Meyer, Log-rank testi; **Kuva 9**).



**Kuva 9.** Tautivapaa seuranta-aika MIB-1 B-värjäysanalyysin perusteella.  
(p = n.s., Log-rank)

Kun FGFR3-värjäykset ryhmiteltiin negatiivisiin (0 = 0) ja positiivisiin (1–3 = 1), todettiin trendi FGFR3:n ja tautivapaan seuranta-ajan välillä. Tulos ei ollut tilastollisesti merkittävä ( $p = 0,064$ , Kaplan-Meyer-käyrät, Log-rank-testi; **Kuva 10**). Kasvaimen positiivinen FGFR3-värjäytyminen näyttää lisäävän sen uusiutumismahdollisuutta.



**Kuva 10.** Tautivapaa seuranta-aika FGFR3-negatiivisilla ja -positiivisilla potilailla. ( $p = 0,064$ , Log-rank)

### 3.5 Coxin monimuuttujamalli

Kun tutkittiin graduksen (1–3), FGFR3:n (ryhminä negatiiviset = 0 ja positiiviset = 1–3 arvot), histologisen tyypin (ependymooma, anaplastinen ependymooma, myksopapillaarinen ependymooma, subependymooma), kasvaimen sijainnin (ryhmittely selkäydin/aivot), iän (ryhmät 0–19, 20–54 ja 55-vuotiaat ja vanhemmat) ja MIB-1 B-värjäytymisindeksin (jako mediaanin perusteella kahteen ryhmään: 0–3 % = 1, yli 3 % = 2) merkitystä kasvainten tautivapaan seuranta-

ajan ennustamisessa, Coxin monimuuttujamallin mukaan ainoastaan kasvaimen sijainti oli merkitsevä ennustetekijä (vaarasuhde Exp (B) 81,18, 95.0 % luottamusväli CI vaarasuhteelle 0,36–18434,02,  $p = 0,112$ ). Kun samassa monimuuttujamallissa tutkittiin kokonaisseuranta-aikaa tautivapaan seuranta-ajan sijaan, ei merkitseviä ennustetekijöitä löydetty.

## 4 POHDINTA

### 4.1 MIB-1

MIB-1-vasta-ainevärjäys on yleisessä käytössä oleva immunohistokemiallinen menetelmä, jonka tiedetään olevan yhteydessä ennusteeseen ja moniin kliinispatologisiin muuttujiin useissa eri kasvaimissa. Tässä tutkimuksessa Ki-67 (MIB-1)-proliferaatioindeksi korreloi merkitsevästi kasvaimen histologiseen tyyppiin ja gradukseseen. Graduksen III anaplastisilla ependymoomilla oli korkein MIB-1 B-värjäytymisindeksi, kun analyysit tehtiin ImmunoRatio-menetelmällä. Korkea Ki-67-proliferaatioindeksi viittaa solujen jakautumisen kiihtyneeseen, mikä sopii ependymoomien aggressiivisimpaan ja huonoennusteisimpaan muotoon eli anaplastiseen ependymoomaan. Matalan graduksen ependymoomien MIB-1-värjäytymisindeksi oli myös pienempi MIB-1 A-värjäyksessä (analyysi CAS-200 kuva-analysaattorilla), mutta tulos ei ollut tilastollisesti merkittävä.

Ki-67-indeksin merkitystä potilaan ennusteeseen on tutkittu paljon. Merkittävää ennustekorrelaatiota kasvaimen uusiutumisen tai eloonjäämisen välillä ei tässä tutkimuksessa voitu osoittaa. Kuten tämän tutkimuksen johdannossa jo todettiin, monissa toisistaan riippumattomissa ependymoomia käsittelevissä tutkimuksissa on kuitenkin havaittu merkittävä korrelaatio korkean Ki-67-proliferaatioindeksin ja huonon eloonjäämisennusteen välillä (30, 37, 38, 15, 61). Ki-67:ää pidetään erään tutkimuksen mukaan jopa gradeerausta luotettavampana ennustetekijänä intrakraniaalisissa ependymoomissa (30). Eloonsijainti oli tutkimuksessa suotuisaa (>5 vuotta) alle 20,5 %:n MIB-1-proliferaatioindeksin saaneilla ja epäsuotuisaa (< 5 vuotta) potilailla, joilla indeksi oli 20,5 % tai korkeampi (30). Mainittakoon, että MIB-1-värjäytymisindeksit ovat omassa tutkimuksessa huomattavasti alhaisempia kuin edellä mainitussa tutkimuksessa. Toisaalta oman tutkimuksen Ki-67-indeksit ovat lähempänä kirjallisuudessa yleisesti raportoituja arvoja (62, 63, 64).



Tässä tutkimuksessa MIB-1 A- ja MIB-1 B-värjäysmenetelmien ja värjäysten analyysin toistettavuus keskenään oli kohtalaisen hyvää. Tosin molemmilla menetelmillä tutkittuja kasvaimia oli aineistossa vain 13 kappaletta, mikä vaikuttaa tuloksen luotettavuuteen. Suuremmalla otoskoolla tulokset saattaisivat olla parempia.

MIB -1 B-menetelmän antamat proliferaatioindeksit ovat keskimäärin korkeampia, sillä näytteestä valittiin tutkittavaksi pienempi alue, joka oli valittu analyysin voimakkaimman proliferaation perusteella. MIB-1 A-menetelmässä kuva-analyysit tehtiin suuremmalta alueelta. Tähän tulokseen vaikuttaa todennäköisesti se, että ependymoomat ovat heterogeenisiä ja proliferaatio vaihtelee tällöin usein alueittain.

Tulokseen saattavat vaikuttaa myös värjäystekniikka ja eri esikäsittelymenetelmät. Tässä tutkimuksessa MIB-1 A-analyysit suoritettiin MIB:n 1: 110 laimennoksena ja MIB-1 B-analyysit 1: 200 laimennussuhteella. Eri julkaisujen välisissä vertailuissa käytetyn MIB-1-vasta-aineen laimennussuhde vaihteli 1:50–1:200 välillä ja myös esikäsittelymenetelmät vaihtelivat, mutta tulokset ennusteen arviossa olivat erilaisista menetelmistä huolimatta usein tilastollisesti merkittäviä. Myös proliferaatioindeksien raja-arvot, jotka jakoivat potilaat eri ennusteryhmiin, vaihtelivat suuresti (1–25 %) (65).

Tutkimukset eri tutkimuskeskusten välillä eivät voi saavuttavaa täydellistä yhteneväisyyttä Ki-67 (MIB-1)-indeksimääritelmien toistettavuudessa (2). Preusserin tutkimus (2) pitää myös ilman kuva-analyysiiä tapahtuvaa, manuaalista laskemista nopeampana, helpompana, halvempaan ja toteuttamiskelpoisempaan tapaan verrattuna Ki-67-indexin kuva-analyysillä tapahtuvaan määrittämiseen. Omassa tutkimuksessa kaikki laskennat suoritettiin automaattisella kuva-analyysillä koneellisesti, mikä saattaa vaikuttaa tuloksiin.

## **4.2 FGFR3**

Tässä tutkimuksessa havaittiin yhteys kasvaimen FGFR3-ekspression ja sen histologisen tyyppin sekä graduksen välillä. Tulosten mukaan gradus II ependymoomilla FGFR3 on useimmiten positiivinen ja matalamman graduksen myksopapillaarisilla ependymoomilla negatiivinen. Anaplastisten ependymooma näytteiden FGFR3-ekspressio jakautui lähes tasaisesti negatiivisiin ja positiivisiin tuloksiin. Otokoko jakautui tasan FGFR3-negatiivisiin (21) ja FGFR3-positiivisiin (21) tuumoreihin, mutta graduksen I ja III näytteitä oli huomattavasti vähemmän kuin graduksen II näytteitä. Chi-

neliötesti vaatii, että sekä koko joukon että jokaisen ryhmän otoskoko on riittävän suuri. Pienen otoskoon takia Chi-neliötesti saattaa antaa suurempia p-arvoja. Vaikka tulos tässä tutkimuksessa on tilastollisesti merkittävä, olisi se luotettavampi, jos otoskoko olisi ollut suurempi ja jos näytteet olisivat jakautuneet tasaisemmin eri ryhmiin.

Kliinispatologisista muuttujista myös iällä on merkitystä kasvaimen FGFR3-ilmentämisen suhteen. 20–54-vuotiailla kasvain oli useimmiten FGFR3-negatiivinen. Nuorille ja lapsille tyypillisempää ovat korkean graduksen kasvaimet, joten tämä tulos tukee edellistä tulosta, jossa gradus II ependymoomat ovat useimmiten FGFR3-positiivisia ja aikuisille tyypillisemmät gradus I tuumorit negatiivisia.

MIB-1- ja FGFR3-värjäysten välillä ei löydetty tilastollista yhteyttä, vaikka FGFR3 oli jaoteltu pelkästään negatiivisiin (värjäytyminen 0) ja positiivisiin (värjäytyminen 1–3) tapauksiin. Positiiviset FGFR3-tuumorit expessoivat enemmän Ki-67:ää kuin FGFR3-negatiiviset. Vaihtelua oli kuitenkin paljon, eikä samansuuntaista tulosta havaittu, kun FGFR3 oli jaoteltuna neljään ryhmään (0–3) värjäytymisen intensiteetin perusteella.

Potilaan eloonjääminen ja kasvaimen residivointi eivät korreloineet merkittävästi FGFR3:n kanssa. Tämän suuntainen trendi voidaan kuitenkin havaita. Kokonaisseurannassa eloonjäämisennuste oli parempi, jos kasvain ei ilmentänyt FGFR3:a. FGFR3-positiivisilla potilailla oli myös suurempi todennäköisyys kasvaimen uusiutumiseen, kun tutkittiin tautivapaata seuranta-aikaa. FGFR3:n merkitystä ependymoomien ennusteen kannalta tulisi kuitenkin tutkia enemmän, jotta luotettavia johtopäätöksiä voisi näiden tuumoreiden kohdalla tehdä. Suuremmalla otoskoolla voitaisiin ehkä saavuttaa tilastollisesti merkittävä yhteys ennusteen ja FGFR3-ekspression välillä. Ependymooman harvinaisuuden takia on kuitenkin vaikea saada koottua yhtä suuria tutkimusjoukkoja kuin yleisemmistä aivokasvaimista.

Tutkimuksia FGFR3:n ilmentymisestä ependymoomissa ei ole aikaisemmin tehty. Tuloksia ei voi siis verrata aikaisempien tutkimusten tuloksiin eikä varmoja johtopäätöksiä pystytäkään tämänkään tutkimuksen perusteella tekemään. FGFR3-geenin fuusioita on kuitenkin tutkittu korkean graduksen aivokasvaimissa, glioblastoomissa. Ensimmäiset tutkimukset paljastivat FGFR3-geenin ja *transforming acidic coiled-coil containing* proteiini 3 (TACC3)-geenin fuusion glioblastoomissa. Fuusiogeneeni löytyi neljästä 48 glioblastooma-potilaan näytteestä, mutta ei yhdestäkään matalan graduksen glioomanäytteistä. Tutkimus osoitti, että FGFR3-TACC3-geenifuusio ilmenee ihmisen syövässä, ja että siitä generoituu onkogeenninen proteiini, joka vahvistaa glioblastooman tuumorigeneesiä. (50, 53) FGFR3-TACC3-fuusiogeneeni on löytynyt myös virtsarakon syövästä (51).

Glioblastoomissa fuusiot koostuivat ensisijaisesti FGFR3:n IIIc isoformeista (50, 53), mutta virtsarakon syövässä isoformi oli muotoa IIIb (51). Isoformia IIIb ilmeentyy tyypillisesti epiteelissä, mikä tukee edellisen tutkimuksen virtsarakkosyöpien havaintoa. Kaikissa FGFR3-fuusiotranskripteissa, isoformista IIIb tai IIIc huolimatta, FGFR3-geenistä peräisin oleva osa jatkuu aina eksonin 18 loppuun. (48) FGFR3-TACC3 positiivisilla glioblastooma-potilailla on havaittu lisäksi mikro-RNA:n säätelyn alaisuudesta poistumista (50).

Muutaatio FGFR- perheen geeneissä on myös mahdollinen. Glioblastoomissa FGFR3-geeniä aktivoivia mutaatioita ei ole havaittu (50), mutta pilosyyttisissä astrozytöomissa on havaittu FGFR1-mutaatioita (66). Mutaatio voi aiheuttaa myös reseptorin yli-ilmenemistä. Tämän tutkimuksen menetelmillä ei voi varmuudella päätellä sitä, mikä FGFR3:seen liittyvä geenimuutos on havaitun immunohistokemiallisen FGFR3-ekspression taustalla ependymoomissa.

FGFR-perheen fuusiot ovat kiinnittäneet tutkijoiden huomion, sillä ne ovat toistuneet useissa tutkimuksissa ja ne toimivat lupaavana lääkehoidon kohderyhmänä. Kliinisiä ongelmia on vielä paljon, sillä FGFR:n ilmenemisvoimakkuus vaihtelee kudoksesta riippuen. Kun suunnitteilla on fuusio-positiivisen potilaan lääkehoito, täytyy FGFR-ilmenemistaso huomioida. Jos FGFR3-TACC3-positiivista glioblastooma-potilasta voitaisiin hoitaa FGFR3-spesifisellä inhibiittorilla, haittavaikutukset saattaisivat olla pienemmät, sillä ei-alteroituneen FGFR3:n ekspressio on aivoissa melko vähäistä. Tällä hetkellä aivoveriesterien läpäisevää FGFR3-spesifistä inhibiittoria ei ole kaupallisena valmisteena, joten lääkehoito on vaikea kohdistaa aivokudokseen. Lääkettä on kuitenkin mahdollista antaa suoraan aivo-selkäydinnesteeseen, jolloin keskushermoston ulkopuoliset elimet ja kudokset, jotka sisältävät runsaasti FGFR:ää, eivät altistu lääkkeen haittavaikutuksille. (48)

## 5 LOPUKSI

Vaikka tässä tutkimuksessa ei saatu merkittävää tulosta MIB-1-värjäytymisindeksin ja ennusteen välillä, MIB-1- indeksi on ollut jo pitkään yleisesti käytössä ependymoomien neuropatologisessa diagnostiikassa ja ennusteen arvioinnissa ja sitä käytetään varmasti myös tulevaisuudessa. Korkea MIB-1-proliferaatioindeksi viittaa huonompaan ennusteeseen ja lisää kasvaimen residivoinnin todennäköisyyttä. FGFR3 saattaa olla uusi lupaava markkeri ependymooman ennusteen arvioinnissa. Lisää tutkimuksia on tehtävä ependymoomien ja myös muiden aivokasvainten FGFR3-ekspression suhteen, jotta FGFR3-geenin merkitys syöpäkasvainten diagnostiikassa varmistuisi. Myös FGFR3-spesifisten inhibiittoreiden käyttö ependymoomien hoidossa voi olla tulevaisuudessa mahdollista.

# LÄHDELUETTELO

1. Louis D, Ohwagi H, Wiestler O, ym. WHO Classification of tumours of the Central nervous System. Lyon: IARC Press 2007; s. 69-80
2. Preusser M, Heinzl H, Gelpi E, ym. Ki67 index in intracranial ependymoma: a promising histopathological candidate biomarker. *Histopathology* 2008; 53: 39-47
3. Waldron JS, Tihan T. Epidemiology and pathology of intraventricular tumors. *Neurosurg Clin N Am* 2003; 14: 469-482
4. Reni M, Gatta G, Mazza E, ym. Ependymoma [Review] [100 refs]. *Crit Rev Oncol Hematol* 2007; 63(1): 81-89
5. Mueller S, Chang S. Pediatric brain tumors: current treatment strategies and future therapeutic approaches. *Neurotherapeutics* 2009;6:570 – 86
6. McGuire C.S, Sainani K.L, Fisher P.G. Incidence patterns for ependymoma: surveillance, epidemiology, and end results study. *J. Neurosurg.* 2009; 110,4: 725-729
7. USA:n aivokasvainrekisteri 2006. <http://www.cbtrus.org>
8. Prayson RA. Clinicopathologic study of 61 patients with ependymoma including MIB-1 immunohistochemistry. *Ann Diagn Pathol* 1999; 3: 11-18
9. Shiffer D, Chio A, Giordana MT, Migheli A, ym. Histologic prognostic factors in ependymoma. *Childs Nerv Syst* 1991; 7: 177-182
10. Kudo H, Oi S, Tamaki N, ym. Ependymoma diagnosed in the first year of life in Japan in collaboration with the International Society for Pediatric Neurosurgery. *Childs Nerv Syst* 1990; 107: 375-378.
11. Komuro Y, Mikami M, Sakaiya N, ym. Tumor imprint cytology of ovarian ependymoma. A case report. *Cancer* 2001; 92: 3165-3169
12. Duncan JA, Hoffman HJ. Intracranial ependymomas. In: *Brain tumors*. Kaye Ah, Lows ER, Jr., eds. Churchill Livingstone 1995; pp. 493-504
13. Pollack I.F, Jakacki R.I. Childhood brain tumors: epidemiology, current management and future directions. *Nat Rev Neurol* 2011; 7,9: 495-506
14. Prayson RA. Myxopapillary ependymomas: a clinicopathological study of 14 cases including MIB-1 and p53 immunoreactivity. *Mod Pathol* 1997; 10:304-310
15. Kurt E, Zheng PP, Hop Wc, ym. Identification of relevant prognostic histopathologic features in 69 intracranial ependymomas, excluding myxopapillary ependymomas and supebendymomas. *Cancer* 2006; 106: 388-395
16. Cervoni L, Caruso R, Gagliardi F.M, ym. Neurinomas and ependymomas of the cauda equina. A review of the clinical characteristics. *Minerva Chir.* 1997; 52, 5: 629-633.

17. Lombardi D, Scheithauer BW, Meyer FB ym. Symptomatic subependymoma: a clinicopathological and flow cytometric study. *J Neurosurg* 1991; 75: 583-588
18. Jallo Gi, Zagzag D, Epstein F. Intramedullary subependymoma of the spinal cord. *Neurosurgery* 1996; 38: 251-257
19. Korshunov A, Golanov A, Timirgazi V. Immunohistochemical markers for intracranial ependymoma recurrence. An analysis of 88 cases. *J Neurol Sci* 2000; 177: 1721-1727
20. Rawlings CE, Giangaspero F, Burger PC, ym. Ependymomas: a clinicopathologic study. *Surg Neurol* 1988; 29: 271-281
21. Torres CF, Korones DN, Pilcher W. ym. Multiple ependymomas in a patient with Turcot's syndrome. *Med Pediatr Oncol* 1997; 28: 59-61
22. Hamilton RL, Pollack IF. The molecular biology of ependymomas. *Brain Pathol* 1997; 7: 807-822
23. Huang B, Starostik P, Schraut H. ym. Human ependymomas reveal frequent deletions on chromosomes 6 and 9. *Acta Neuropathol* 2003; 106:357-362
24. Stratton MR, Darling J, Lanton PL ym. Cytogenetic abnormalities in human ependymomas. *Int J Cancer* 1989; 44:579-581
25. Korshunov A, Neben K, Wrobel G ym. Gene expression patterns in ependymomas correlate with tumor location, grade and patient age. *Am J Pathol* 2003; 163: 1721-1727
26. Taylor MD, Poppleton H, Fuller C ym. Radial glia cells are candidate stem cells of ependymoma. *Cancer Cell*; 2005; 8: 323-335
27. Ernestus RI, Schoder R, Stutzer H ym. The clinical and prognostic relevance of grading in intracranial ependymomas. *Neurosurg* 1997; 11:421-428
28. Sonneland PR, Scheithauer BW, Onofrio BM. Myxopapillary ependymoma. A clinicopathological and immunohistochemical study of 77 cases. *Cancer* 1985; 56:883-893
29. Merchant TE, Jenkins JJ, Burger PC ym. Influence of tumor grade on time to progression after irradiation for localized ependymoma in children. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53:52-57
30. Wolfsberger S, Fischer I, Hoftberger R, ym. Ki-67 immunolabeling index is an accurate predictor of outcome in patients with intracranial ependymoma. *Am J Surg Pathol* 2004; 28:914-920
31. Rosenblum MK. Ependymal tumors: A review of their diagnostic surgical pathology. *Pediatr Neurosurg* 1998; 28:160-165
32. Korshunov A, Golanov A, Sycheva R ym. The histologic grade is a main prognostic factor for patients with intracranial ependymomas treated in the microneurosurgical era : an analysis of 258 patients. *Cancer* 2004; 100:1230-1237
33. Horn B, Heideman R, Greier R ym. A multi-institutional retrospective study of intracranial ependymoma in children: identification of risk factors. *J Pediatr Hematol Oncol* 1999; 21:203-211

34. Gerdes J, Schwap U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer* 1983;31:13–20
35. Urruticoechea A, Smith I, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(28): 7212-20
36. Cattoretti G, Becker MH, Key G. ym. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* 1992; 168:357-363
37. BennettoL, Foreman N, Harding G, ym. Ki-67 immunolabelling index is a prognostic indicator in childhood posterior fossa ependymomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998; 24: 434-440
38. Zamecnik J, Snuderl M, Eckschlager R, ym. Pediatric intracranial ependymomas: prognostic relevance of histopatological, immunohistochemical, and flow cytometric factors. *Mod Pathol* 2003; 16:980-991
39. Figarella-Branger D, Gambarelli D, Dollo C. ym. Infratentorial ependymomas of chlidhood. Correlation between histological features, immunohistological genotype, silver nucleolar, organizer region, staining values and post-operative survival in 16 cases. *Acta Neuropathol* 1991; 82: 208-216
40. Korshunov A, Golanov A, Timirgaz V. Immunohistochemical markers for prognosis of ependymal neoplas. *J Neurooncol.* 2002; 58(3) 255-270
41. Verstegen MJ, Leenstra DT, Ijlst-keizers H ym. Proliferation- and apoptosis-related proteins in intracranial ependymomas: an immunohistochemical analysis. *J Neurooncol* 2002; 56: 21-28
42. Preusser, M, Wolfsberger S, Czech T. ym. Surviving expression in intracranial ependymomas and its correlation with tumor cell proliferation and patient outcome. *SourceAm.J.Clin.Pathol*; 2005; 124, 4:543-549
43. Suzuki S, Oka H, Kawano N ym. Prognostic value of Ki-67 (MIB-1) and p53 in ependymomas. *Brain Tumor Pathol* 2001; 18:151-154
44. Powers C, McLeskey S, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endoct Relat Cancer* 2000; 7:165-197
45. Mäkinen M, Carpén O, Kosma VM, ym. *Patologia. Suomi: Kustannus Oy Duodecim* 2012
46. Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature Rev Cancer* 2010; 10: 116-129
47. Holzmann K, Grunt T, Heinzle C, ym. Alternative splicing of fibroblast growth factor receptor IgIII liips in cancer. *J Nucleic Acids* 2012; 950508
48. Parker B, Engels M, Annala M, ym. Emergence of FGFR family gene fusions as therapeutic targets in a wide spectrum of solid tumours. *J Pathol* 2014; 232:4-15
49. Annala M, Parker B, Zhang W, ym. Fusion genes and their discovery using high throughput sequencing. *Cancer Lett* 2013; 340: 192-200
50. Parker B, Annala M, Cogdell D, ym. The tumorigenic FGFR3- TACC3 gene fusion escapes miR-99a regulation in glioblastoma. *J Clin Invest* 2013; 123(2): 855-65

51. Williams S, Hurst C, Knowles M. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Hum Mol Genet* 2013; 795-803
52. Wu Y, Su F, Kalyana-Sundram S, ym. Identification of targetable FGFR gene fusions in diverse cancers. *Cancer Discov* 2013; 3: 636-647
53. Singh D, Chan J, Zoppoli P, ym. Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma. *Science* 2012; 337: 1231-1235
54. Kumar-sinha C, Tomlins S, Chinnayan A. Recurrent gene fusions in prostate cancer [review]. *Nat rev Cancer* 2008; 8(79): 497-511
55. Van Rhijn B, Montironi R, Zwarthoff E, ym. Frequent FGFR3 mutations in urothelial papilloma. *J Pathol* 2002; 198: 245-251
56. Chesi M, Nardini E, Brents L, ym. Frequent translocation t(4;14)(p16;q32.3) in multiple myeloma associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nature Genet* 1997; 16:260-264
57. Zacharoulis S, Moreno L. Ependymoma: an update. *J Child Neurol* 2009;24:1431 - 8.
58. Liu A, Shing M, Yuen H, ym. Timing of adjuvant radiotherapy and treatment outcome in childhood ependymoma. *Pediatric Blood and Cancer* 2014; 61(49): 606-611
59. Grundy RG, Wilne SA, Weston CL ym. Primary postoperative chemotherapy without radiotherapy for intracranial ependymoma in children. The UKCCSG/SIOP prospective study. *Lancet Oncol* 2007; 8,8: 696-705
60. Sievert AJ, Fisher MJ. Pediatric low-grade gliomas. *J. Child Neurol* 2009; 24,11: 1397-1408
61. Vitanovics D, Balint K, Hanzely Z, ym. Ependymoma in adults: surgery, reoperation and radiotherapy for survival. *Pathol Oncol Res* 2010; 16, 1:93-99
62. Ritter A, Hess K, McLendon R, ym. Ependymomas: MIB-1 proliferation index and survival. *J Neurooncol* 1998; 40 (1):51-57
63. Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I, ym. Ki-67 immunoreactivity in human central nervous system tumors: a study with MIB 1 monoclonal antibody on archival material. *Acta Neuropathol* 1994; 87(1):47-54
64. Schröder R, Ploner C, Ernestus R. The growth potential of ependymomas with varying grades on malignancy measured by Ki-67 labelling index and mitotic index. *Neurosurg Rev* 1993; 16, 2:145-150
65. Kuncova K, Janda A, Kasal P, ym. Immunohistochemical prognostic markers in intracranial ependymomas: systemic review and meta-analysis. *Pathol Oncol Res.* 2009; 15, 4:605-614
66. Jones D, Hutter B, Jager N, ym. Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nat Genet* 2013; 45(8): 927-932